

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

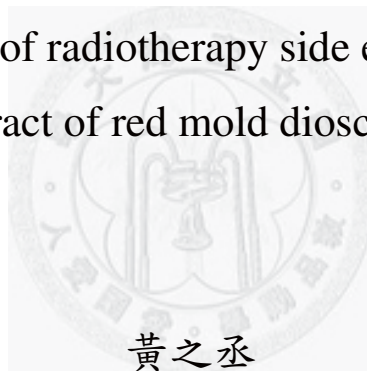
College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

紅麴山藥酒精萃取物緩解放射線治療衍生之副作用

The moderation of radiotherapy side effects by ethanol  
extract of red mold dioscorea



黃之丞

Chih-Chen Huang

指導教授：潘子明 博士

Advisor: Tzu-Ming Pan, Ph.D.

中華民國 99 年 6 月

June, 2010

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

紅麴山藥酒萃物緩解放射線治療衍生之副作用  
The moderation of radiotherapy side effects by  
ethanol extract of red mold dioscorea

本論文係黃之丞君 (學號 R97B47101) 在國立臺灣大學  
微生物與生化學研究所完成之碩士學位論文，於民國 99 年  
05 月 15 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證  
明

口試委員：

潘子明

(簽名)

(指導教授)

蘇遠志

黃健雄

唐昭暉

蘇英傑

系主任、所長

潘子明

(簽名)

## 致謝

人生的每個境遇，無非是因緣際會，能與臺灣大學結緣，並涉入紅麴相關領域浸淫，乃今生莫大之榮幸。歷經兩年的努力，一本屬於我的碩士論文終於完成了，當口試委員宣布-黃同學恭喜你通過碩士論文口試時，心中的激動是無法用言語形容的。

研究之路漫漫，但不孤寂，由衷感謝我的指導教授潘子明博士，願意在眾多來至各大名校的學生中，選擇技職體系出生的我，讓我有機會在他的門下成長與茁壯，心中無限感激。在研究生涯中，潘老師對於學子的關心與寬容，讓身為外地遊子的我備感溫馨，對於研究慎密思考與謹慎的態度以及重視學術與產業結合之理念，亦讓我更加瞭解所謂的科學研究，能夠成為實驗室的一份子，是一種幸福，也是一種驕傲。本論文承蒙國立臺灣大學微生物與生化學研究所蘇遠志與黃建雄教授、財團法人食品工業發展研究所廖啟成副所長以及國立陽明大學生化暨分子生物研究所蔡英傑教授的細心審閱與指導，使得研究內容更加充實與完整，在此獻上十二萬分的謝意。

感謝弘光科技大學食品暨應用生物科技系羅蕙芬（敏方）教授和國立嘉義大學應用化學系暨研究所林榮流教授，如果不是你們在大學期間的研究基礎奠定與照顧，沒有今天的我。此外也感謝弘光科技大學食品暨應用生物科技系林麗雲主任與弘光科技大學營養系蔡玉鈴老師在求學期間的幫忙與照顧，謝謝妳們。

接下來要對陪伴我兩年碩士班時光的實驗室夥伴說一句感恩。牛隻收容所所長秉穎學長，沒有你的收留與實驗上的建議，我這頭牛至今還不知在哪裡吃草。酸溜溜二人組的宗偉學長，一開口 pH meter 下探谷底測不到指數，感謝您在實驗期間的鼓勵並陪我酸人，讓我不覺孤單。什麼都會什麼都不稀奇的志輝學長，每當實驗有問題只要大喊一聲阿~輝~救命阿~就馬上出現幫我解決問題，真是不

敢想像往後沒有你的日子。紅蘿蔔大嬌姿杏，讓我了解到原來紅蘿蔔星球的人都是天真、單純又善解人意，為了感謝你在求學間的幫忙，我決定送你一屋子的紅蘿蔔，相信你一定會很開心（先吐死~哇哈哈）。心靈導師建利學長，在心情不好或是人生失去方向時，謝謝你的鼓勵與建議，我們之間的默契已經好到用眼神交流，不用用到喇叭嘴。整天都裝很閒的莊佳穎，謝謝你在求學期間任我欺負，我深感慚愧，希望你不要記前嫌讓我投入你門下學吹薩克斯風、彈鋼琴、跳土風舞、當個襯職的電玩小開...et al。家有一兔如有一寶的賀培，謝謝你在實驗期間和口試時的幫忙，希望你能考上理想的學校，到時我再送你一隻 CO<sub>2</sub> 當作賀禮。生工組之花瑋萱，雖然我對你自封組花很不以為然，但我還是謝謝你在碩一時，陪我一起熬過放射線時期。此外也謝謝中醫所雅雯學姐、力川學長和羽涵學妹提供黃色素與實驗建議。郁蓁學姐在我最徬徨無助的時候，不厭其煩的教我實驗。正勳學長與珮爾學姊在放射線實驗方面的指導。國權在動物實驗與結果詮釋上的幫忙。錦峰、岳庭、慎思、奕蓁、俊賢、瑞蘭、政倫、智夫、雨青、保宏、珮祺、羽潔、文豪、雅芸和伊絢在 meeting 時的意見分享，讓我更加成長，謝謝。另外也要感謝幸運之神兼 SEM 室之花憲堂，有你出現的地方我就會好運連連。弘光的好朋友柏諭、小筑、頤琳，一路上，一直支持我，鼓勵我，謝謝你們。

最後我想把我所有的成就與喜悅獻給我最敬愛的爸爸、媽媽、姐姐與妹妹，一路上如果沒有你們大力的支持以及不厭其煩的心靈輔導，我真不知我能不能熬過這艱辛的人生道路，我真的很愛很愛你們!!

當你能飛的時候就不要放棄飛

當你能夢的時候就不要放棄夢

用最少的悔恨面對過去

用最少的浪費面對現在

用最多的夢面對未來

黃之丞 謹誌於國立臺灣大學農業化學舊館 105 室

中華民國九十九年五月十八日

## 縮寫表

AAP (acetaminophen)	乙醯胺酚
ATM (ataxia telangiectasia mutated)	共濟失調-微血管擴張症突變基因
ATR (ATM-Rad3-related)	共濟失調-微血管擴張症突變- Rad3-相關基因
CHK2 (cell cycle checkpoint kinase 2)	細胞週期檢查點激酶 2
DMSO (dimethyl sulfoxide)	二甲基亞砜
DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)	Dulbecco's 改良最低必需培養液
DPPH ( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl)	1,1-二苯基苦基苯肼
ECM (extracellular matrix)	胞外基質
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	酵素連結免疫吸附法
EtBr (ethidium bromide)	溴化乙菲錠
FBS (fetal bovine serum)	胎牛血清
GABA ( $\gamma$ -amino butyric acid)	$\gamma$ -胺基丁酸
GST (glutathione-s-transferase)	穀胱甘肽轉化酶
Gy (gray)	放射線劑量單位
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)	4-(2-羥乙基)-1-哌嗪乙 烷磺酸半鈉鹽
H&E (Hematoxylin & Eosin staining)	蘇木紫與伊紅染色
HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A)	3-羥基 3-甲基戊二酸醯輔酶
HPLC (high-performance liquid chromatography)	高效能液相層析法
IL-1 (interleukin-1)	介白素-1
IL-6 (interleukin-6)	介白素-6
IR (irradiation)	放射線照射
LLC-LM (Lewis lung carcinoma-C57BL/6 mice)	肺癌細胞株荷瘤 C57BL/6 小鼠

LPO (lipid peroxidation) 脂質過氧化

PBS (phosphate buffered saline) 磷酸鹽緩衝液

PCR (polymerase chain reaction) 聚合酶鏈反應

PDA (Potato Dextrose Agar) 馬鈴薯葡萄糖培養基

RMDE (ethanol extract of red mold dioscorea) 紅麴山藥酒萃物

RMDE (ethanol extract of red mold rice) 紅麴米酒萃物

RNS (reactive nitrogen species) 活性氮屬

ROS (reactive oxygen species) 活性氧屬

RP (radiation pneumonitis) 放射性肺炎

RT (radiotherapy) 放射線治療

RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 反轉錄聚合酶鏈反應

SDS (sodium dodecyl sulfate) 十二烷基硫酸鈉

SHRs (spontaneously hypertensive rates) 自發性高血壓大鼠

TAM (tumor-associated macrophage) 腫瘤相關巨噬細胞

TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) 轉型生長因子- $\beta$

TI (tumor injection) 腫瘤注射

TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 腫瘤壞死因子- $\alpha$

TNFR (tumor necrosis factor receptors) 腫瘤壞死因子受體

TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) 佛波醇酯

VEGF (vascular endothelial growth factor) 血管內皮細胞生長因子

UVB (ultraviolet B) 紫外光 B

## 中文摘要

放射線治療為有效控制腫瘤的癌症治療方式。放射線雖然能抑制癌細胞增生和毒殺癌細胞，但也會因發炎與纖維化反應而對正常組織造成傷害。因此，如何減少放射線治療衍生的副作用為一重要課題。紅麴 (*Monascus*) 為中國傳統發酵真菌，運用在食品上已有數千年的歷史，其二次代謝產物經現代科學研究證實具有降低膽固醇、抗發炎、抗腫瘤與抑制腫瘤轉移等功效，適合輔助放射線治療減輕副作用。本研究分為體內動物實驗和體外細胞實驗兩部分，探討紅麴山藥酒萃物 (ethanol extract of red mold dioscorea, RMDE) 是否具有緩解放射線治療衍生的副作用之功效。實驗結果顯示，RMDE 的餵食，能增加放射線治療後小鼠的體重和攝食量，並且抑制腫瘤的復發。此外，RMDE 能緩解放射線所引起脾臟腫大之情形，血清促發炎激素 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ; interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ; interleukin-6, IL-6)、促纖維化激素 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 和血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 也因 RMDE 的餵食，具有顯著性降低的現象。由組織病理切片結果得知，RMDE 對於小鼠肺、肝和腎臟並無任何的影響。在細胞實驗方面，RMDE 中的 ankaflavin 和 citrinin 對於小鼠皮膚初代細胞和 B16-F0 並不具明顯抑制效果，而 monascin 對於小鼠皮膚初代細胞不具明顯抑制，但可以有效抑制癌細胞 (B16-F0) 的生長。在放射線誘導細胞損傷模式中，紅麴山藥酒萃物和其功效成分 ankaflavin 能抑制放射線所誘發 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 大量表現之情形，monascin 對 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表現具抑制作用，但對於 TNF- $\alpha$  則不具影響。綜合以上，紅麴山藥酒萃物能緩解放射線治療衍生的副作用，適合輔助臨床癌症治療。

**關鍵字：**放射線治療、紅麴、副作用、發炎、纖維化

## Abstract

Radiotherapy is frequently used as part of cancer treatment to achieve tumor control. Apart from inducing anti-proliferative and cell-killing effects in tumor tissue, radiotherapy also provokes normal tissue damage such as inflammation and fibrosis. Therefore, how to alleviating the side effects of radiotherapy is a crucial problem. The *Monascus* species is a Chinese traditional fermentation fungus used on food for over thousands of years in China. The secondary metabolites of *Monascus* in the contemporary research were confirmed the suppression cholesterol production, anti-inflammation, anti-tumor and suppression tumor metastasis. Accordingly, *Monascus* metabolites can apply to radiotherapy to alleviate the side effects. In this study, we investigated whether ethanol extract of red mold dioscorea (RMDE) attenuates radiation-induced normal tissue damage *in vivo* and *in vitro*. Results showed that oral administration of RMDE can increase animal body weight and food intake but suppress tumor regression. Besides, radiation-induced splenomegaly was significantly alleviated by RMDE. The pro-inflammatory (i.e. tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ; interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ; interleukin-6, IL-6), pro-fibrotic (i.e. transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) and angiogenesis (i.e. vascular endothelial growth factor, VEGF) maker in serum of RMDE treatment group was significantly lower than control group. Furthermore, the results of histopathological slices of lung, liver and kidney in each group did not show any significant difference from histopathological finding. *In vitro* assays, the cytotoxic assay showed that RMDE have more cytotoxic to B16-F0 cells than skin primary cells. Ankaflavin, monascin and citrinin are non-effect in skin primary cells. Monascin can inhibit B16-F0 proliferation. According to the radiation-induced cell damage model, RMDE and ankaflavin treatment can inhibit TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and TGF- $\beta$ 1 mRNA expression and monascin can inhibit IL-1 $\beta$ , IL-6 and TGF- $\beta$ 1 mRNA expression but not TNF- $\alpha$ . These features of RMDE have made it an attractive candidate to moderate the side effects in clinical radiotherapy.

**Keywords:** radiotherapy, *Monascus*, side effects, inflammation, fibrosis



## 目錄

致謝.....	I
縮寫表.....	III
中文摘要.....	V
Abstract.....	VI
目錄.....	VII
圖目錄.....	X
表目錄.....	XII
第一章 前言.....	01
第二章 文獻回顧.....	03
一、紅麴 ( <i>Monascus</i> ).....	03
(一) 紅麴之歷史回顧.....	03
(二) 紅麴之分類與特性.....	03
(三) 紅麴代謝產物與其生理功效.....	04
1. 膽固醇合成抑制劑 (monacolins).....	04
2. 紅麴色素 ( <i>Monascus pigment</i> ).....	06
3. 神經傳導與降血壓物質 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA).....	07
4. 抗氧化物質 (dimerumic acid).....	07
5. 橘黴素 (citrinin).....	08
二、放射線治療 (radiotherapy, RT).....	08
(一) 放射線之分類.....	09
(二) 放射線治療之原理.....	09
(三) 放射線治療衍生的副作用 (side effects).....	10
1. 放射線引起的發炎反應.....	13
2. 放射線引起的纖維化反應.....	14

3. 放射線引起的血管新生.....	16
三、研究目的與大綱.....	17
第三章 材料與方法.....	19
一、實驗材料.....	19
(一) 常用儀器.....	19
(二) 藥品與試劑.....	20
(三) 菌株與基質.....	21
二、實驗方法.....	21
(一) 紅麴菌株之培養.....	21
(二) 紅麴山藥之製備.....	21
(三) 紅麴山藥酒萃物之製備.....	21
(四) 紅麴山藥酒萃物之成分分析.....	22
(五) 動物實驗.....	22
1. 動物飼養與照料.....	22
2. 動物實驗分組與劑量之訂定.....	22
3. C57BL/6 小鼠放射線治療模式之建立.....	23
4. 實驗動物之犧牲 (sacrifice).....	25
5. 血清促發炎激素 (IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ ) 分析.....	29
6. 血清纖維化指標 TGF- $\beta$ 1 分析.....	30
7. 血清血管新生指標 VEGF 分析.....	30
(六) 細胞實驗.....	31
1. 細胞培養.....	31
2. 細胞凍存.....	31
3. 初代細胞之分離.....	31
4. 細胞毒性試驗.....	32
5. 放射線誘導細胞發炎模式之建立.....	32

6. 紅麴山藥萃取物與其純物質對於放射線誘發之發炎反應探討 .....	33
7. 總 RNA 之萃取 .....	33
8. 總 cDNA 之合成 .....	34
9. 引子 (primer) 之設計 .....	34
10. 聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 條件 .....	34
11. DNA 的洋菜膠體電泳分析 .....	34
(七) 生物統計分析方法 .....	36
第四章 結果與討論 .....	37
一、動物實驗 .....	37
(一) 紅麴山藥酒萃物對於放射線療程後小鼠體重與攝食量之影響 .....	37
(二) 紅麴山藥酒萃物對於放射線療程後小鼠腹水之影響 .....	41
(三) 紅麴山藥酒萃物對於放射線療程後小鼠腫瘤之變化 .....	44
(四) 紅麴山藥酒萃物對於放射線治療後小鼠組織器官之影響 .....	47
(五) 紅麴山藥酒萃物對於放射線療程後小鼠血清之影響 .....	56
1. 血清促發炎激素 (IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ ) 分析 .....	56
2. 轉換生長因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 分析 .....	61
3. 血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 分析 .....	61
二、細胞實驗 .....	63
(一) 比較紅麴山藥酒萃物及其純物質對於黑色素細胞瘤 (B16-F0) 和皮膚初代細胞 (skin primary cell) 之影響 .....	63
(二) 放射線誘導 Raw 264.7 細胞發炎模式之建立 .....	66
(三) 紅麴山藥酒萃物及其純物質對於放射線誘發 Raw 264.7 細胞發炎之影響 .....	69
(四) 紅麴山藥酒萃物及其純物質對於放射線誘發 TGF- $\beta$ 1 之影響 .....	76
(五) 紅麴山藥酒萃物緩解放射線治療衍生副作用之作用機制 .....	76
第五章 綜合討論 .....	80
第六章 參考文獻 .....	83

## 圖目錄

圖 2-1 膽固醇生合成路徑.....	05
圖 2-2 DNA 損傷訊息傳遞路徑.....	11
圖 2-3 放射線衍生效應之進展過程.....	12
圖 2-4 放射線纖維化的關鍵過程.....	15
圖 2-5 本論文研究大綱.....	18
圖 3-1 實驗日程與組別.....	24
圖 3-2 A：正常鼠與腫瘤鼠比較圖；B：正常鼠與腫瘤鼠 X 光影像圖.....	26
圖 3-3 A：放射線治療平台；B：小鼠保定情形.....	27
圖 4-1 實驗期間 C57BL/6 小鼠體重變化圖.....	38
圖 4-2 不同時期 C57BL/6 小鼠腫瘤體積.....	39
圖 4-3 實驗期間 C57BL/6 小鼠平均攝食量之變化.....	40
圖 4-4 C57BL/6 小鼠放射線療法後之腹水發生率.....	42
圖 4-5 正常鼠與腹水鼠之比較.....	43
圖 4-6 不同時期 C57BL/6 小鼠腫瘤 X 光影像圖.....	45
圖 4-7 實驗動物之腫瘤組織病理切片 (400 倍放大).....	46
圖 4-8 臟器外觀圖。A：肺臟、B：腎臟.....	49
圖 4-9 臟器外觀圖。A：肝臟、B：脾臟.....	50
圖 4-10 肺臟組織切片 (40 倍放大).....	51
圖 4-11 腎臟組織切片 (40 倍放大).....	52
圖 4-12 肝臟組織切片 (40 倍放大).....	53
圖 4-13 C57BL/6 小鼠脾臟腫大病理程度.....	54
圖 4-14 脾臟組織切片 (40 倍放大).....	55
圖 4-15 放射線治療後 C57BL/6 小鼠血清 TNF- $\alpha$ 表現.....	57

圖 4-16 放射線治療後 C57BL/6 小鼠血清 IL-1 $\beta$ 表現.....	59
圖 4-17 放射線治療後 C57BL/6 小鼠血清 IL-6 表現.....	60
圖 4-18 放射線治療後 C57BL/6 小鼠血清 TGF- $\beta$ 1 表現.....	62
圖 4-19 放射線治療後 C57BL/6 小鼠血清 VEGF 表現.....	64
圖 4-20 RMDE 抑制 B16-F0 和皮膚初代細胞生長之劑量與時間關係.....	67
圖 4-21 Ankaflavin、monascin 和 citrinin 對於 B16-F0 和皮膚初代細胞生長 之劑量關係。.....	68
圖 4-22 不同放射線劑量照射 Raw 264.7 細胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 mRNA 表現之影響.....	70
圖 4-23 以放射線照射不同時間 Raw 264.7 細胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 mRNA 表現之影響.....	71
圖 4-24 放射線照射後處以不同樣品處理時 Raw 264.7 細胞中 TNF- $\alpha$ mRNA 表現之影響.....	73
圖 4-25 放射線照射後處以不同樣品處理時 Raw 264.7 細胞中 IL-1 $\beta$ mRNA 表現之影響。.....	74
圖 4-26 放射線照射後處以不同樣品處理時 Raw 264.7 細胞中 IL-6 mRNA 表現之影響。.....	75
圖 4-27 放射線照射後處以不同樣品處理時 Raw 264.7 細胞中 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表現之影響。.....	77
圖 4-28 紅麴山藥酒萃物緩解放射線治療衍生副作用之作用機制圖.....	78

## 表目錄

表 3-1 引子之計 .....	35
表 4-1 C57BL/6 小鼠於放射線治療後不同處理組織病理綜合評估 .....	48
表 4-2 紅麴山藥酒萃物 monacolin K、ankaflavin、monascin 及 citrinin 含量 .....	65



## 第一章 前言

放射線治療 (radiotherapy) 為現行癌症治療的重要策略之一，臨床上，約有 60% 的癌症病患需要接受放射線治療 (Marples et al., 2003)。非侵入性且對腫瘤本身具有一定的治療效果為其優點。但在放射線治療的過程中，放射線除了會針對腫瘤細胞進行毒殺以外，亦會使得細胞氧化壓力增加而傷害周邊正常組織，嚴重影響治療的效果。

放射線治療的原理係利用高能量的放射束，對腫瘤細胞細胞膜、細胞核中的 DNA 或細胞內的粒線體進行破壞，改變細胞代謝模式或使細胞生長停滯，進而降低對生物體的傷害 (Olive, 1998)。由於實體腫瘤 (solid tumor) 中並不全然是由腫瘤細胞組成，還包含了纖維母細胞 (fibroblasts) 與巨噬細胞 (macrophage)，因此，當放射線對於腫瘤進行照射時，會直接或間接誘使纖維母細胞與巨噬細胞大量分泌 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和 interleukin-6 (IL-6) 等促發炎激素，使得身體產生發炎 (inflammation) 反應；亦或是活化 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 啟動 smad 訊息傳遞路徑導致組織纖維化 (fibrosis)，使得組織功能失調，兩者最終皆會導致癌化 (carcinogenesis) 的產生。此外，過去研究顯示，高能量的放射治療容易引起腫瘤轉移，且運用非致死性劑量處理腫瘤細胞後，能激發轉移相關訊息的活化 (Bea et al., 2003; Dent et al., 2003)。由此可知，如何避免放射線對於正常細胞的傷害，為現行癌症治療急需探討的課題。

紅麴 (*Monascus*) 發酵食品為中國傳統食品，常用於色素與防腐劑的添加。根據《本草綱目》記載，紅麴具「活血」之功效，可見在中國古代，紅麴就已被視為保健藥材。近年來有關紅麴的研究日益活絡，目前已被發表的文獻所提及之保健功效包含有：降血壓 (Kohama et al., 1987; Wu et al., 2009)、降血脂 (Lee et al., 2006a; Lee et al., 2007a)、抗氧化 (Aniya et al., 1999)、抗發炎 (Akihisa et al.,

2005a; Lee et al., 2006b; Lee et al., 2008; Tsai et al., 2009)、促進癌細胞凋亡 (Su et al., 2005)、抗疲勞 (Wang et al., 2006)、抗癌 (Akihisa et al., 2005b; Yasukawa et al., 1996)、抑制癌細胞轉移 (Ho and Pan, 2009) 和預防阿茲海默症 (Lee et al., 2007b) 等。此外，本研究室先前的研究結果發現，進行紅麴發酵時，以山藥當基質取代傳統的米類發酵，具有較高的黃色素生成量 (Lee et al., 2006b; Lee et al., 2007a)。

有鑑於放射線治療所衍生的副作用，紅麴對於臨床癌症輔助性治療符合國人「醫食同源、藥食同根」的觀念，且紅麴在中醫學上使用已有好幾百年的歷史，可說是從傳統中藥發展為現代製劑的優先選擇中藥。因此，本研究擬探討紅麴對於放射線治療所衍生的副作用之影響，盼將其發展成為臨床癌症治療之良好輔助劑。





## 第二章 文獻回顧

### 一、紅麴 (*Monascus*)

#### (一) 紅麴之歷史回顧

紅麴 (*Monascus*) 的使用至今已有一千多年歷史，長久以來一直被國人視為珍品。紅麴究竟源於何時至今已不可考，三國辭賦家王粲在其作品提及「瓜州紅麴，參揉相，軟潤膏潤，入口流散」為紅麴最早的文字證據。十一世紀中國的北宋，宋人陶谷在《清異錄》一書中提到「有賜緋羊，其法以紅麴煮肉，緊卷石鎮，深入酒骨醃透，切如紙薄，乃進」為紅麴用於飲食的最早紀錄。而有關紅麴使用於醫療方面的記載，則可追溯到元朝吳瑞所撰的《日用本草》一書中提到「用紅麴釀酒，破血行藥勢」。明朝宋應星所著《天工開物》中提及「丹麴為一種世間最腐朽物，而此物薄施塗抹，能固其質于炎暑之中，經歷旬日，色味不離初，蓋奇藥也」。根據明朝李時珍撰的《本草綱目》記載「紅麴主治消食活血，健脾燥胃」，可見在中國古代，紅麴就已被視為保健藥材。然而真正引領紅麴走向醫學研究之門的，則可追溯至 1979 年日本東京農工大學遠藤 (Endo) 教授，他自紅麴菌培養液中分離出天然的膽固醇合成抑制劑 monacolin K，引起了各方的注意，也為日後紅麴研究之路奠定基礎。

#### (二) 紅麴之分類與特性

紅麴又名丹麴或赤麴。在分類學上屬於真菌界 (Eumycophyta)、子囊菌門 (Ascomycota)、真子囊菌綱 (Euascomycetes)、散囊菌目 (Eurotiales)、紅麴菌科 (Monascaceae)、紅麴菌屬 (*Monascus*)、紅麴菌種 (*Monascus* spp.)。目前紅麴菌主要分為 *Monascus ruber*、*Monascus purpureus*、*Monascus pilosus*、*Monascus anka*、*Monascus floridanus*、*Monascus pallens* 和 *Monascus sanguineus* 七種。在特性上，紅麴菌為雌雄同體 (homothallic)，菌絲為透明、褐色或紅色，營養菌絲

呈現不規則分歧，有橫隔 (septa) 構造，行無性 (asexual reproduction) 或藉由子囊果 (ascocarp) 行有性生殖。

### (三) 紅麴代謝產物與其生理功效

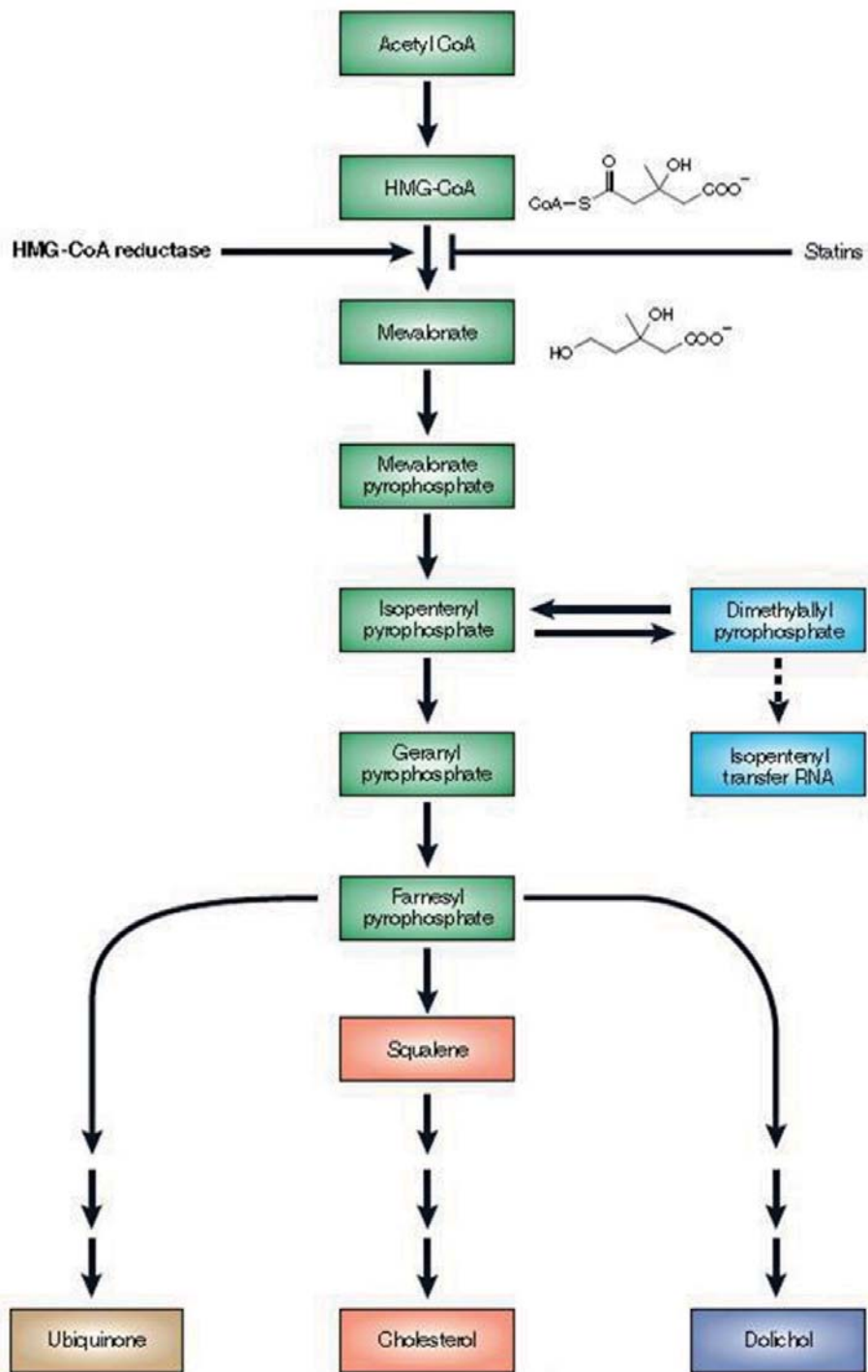
紅麴研究之所以變為熱門，主要在於發酵所產生的多種代謝產物，具有良好的生理功效與經濟價值。酯類、醇類和酸類為紅麴發酵常見的一級代謝產物 (primary metabolites)，常應用於美容與清潔用品的添加。膽固醇合成抑制劑 (monacolins)、紅麴色素 (pigment)、神經傳導與降血壓物質 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)、抗氧化物質 (dimeric acid) 和橘黴素 (citrinin) 則為常見的二級代謝產物 (secondary metabolites)，為近期研究的焦點。

#### 1. 膽固醇合成抑制劑 (monacolins)

Monacolins 為紅麴菌發酵時所產生一系列結構相似的多酮類化合物 (polyketides)，其中以 monacolin K 首先被日本遠藤教授證實具有降膽固醇功效 (Endo, 1979)。Monacolin K 屬 statin 類化合物，為一白色結晶，分子式為  $C_{24}H_{36}O_5$ ，分子量 404.55，於 231、238 和 247 nm 波長處有最大吸光值 (Alberts et al., 1980)，不溶於水，但可溶於 methanol、ethanol 和 acetonitrile 等有機溶劑中。

Monacolin K 之所以具降膽固醇的功效，主要在於它的結構類似於 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 能與其競爭膽固醇合成的速率限制酵素 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) 上的四個活性區位，使得 mevalonate 無法生成，影響膽固醇的合成，進而達到降低膽固醇的效果 (圖 2-1)。

此外，許多文獻亦指出 statin 類化合物具有抗發炎 (Lefler 2002; McCullough 2001; Yeung and Tsao 2002)、抑制癌細胞生長與促進腫瘤細胞凋亡 (Mo and



(Tobert, 2003)

圖 2-1 膽固醇合成路徑

Fig. 2-1 The cholesterol biosynthesis pathway.

Elson, 2004; Shellman et al., 2005; Wong et al., 2002)、減少腫瘤轉移 (Alonso et al., 1998; Nubel et al., 2004; Ho and Pan, 2009) 與強化放射線治療 (Rozados *et al.*, 2005) 等功效。在糖尿病 (Danesh and Kanwar, 2004)、心血管疾病 (Muravyov et al., 2004)、骨質疏鬆 (Mundy et al., 1999) 與阿茲海默症 (Miida et al., 2005) 等慢性疾病方面亦有良好減緩之效果。

## 2. 紅麴色素 (*Monascus pigment*)

紅麴之所以廣受大眾喜愛，一大部分原因要歸功於紅麴菌發酵代謝所產生的紅麴色素。文獻指出，紅麴色素具有極高的安全性 (蘇與黃, 1981) 故認為是良好的天然食品添加物。它除了可以賦予食物鮮豔的色澤增加食物的風味外，亦具有良好之保健功效。紅麴色素主要分為三大類，紅色素：rubropunctamine 和 monascorubramine，黃色素：monascin、ankaflavin、yellow II 和 xanthomonascin A，橘色素 rubropunctatin 和 monascorubrin，當中黃色素與紅色素分別為橘色素的還原物與氮取代物。

黃色素 ankaflavin 和 monascin 經文獻報導指出具有良好抗發炎的效果 (Lee et al., 2006b; Tsai et al., 2009) 且對老鼠脾臟 T 細胞具有免疫抑制的作用 (Martinkova et al., 1999)。Ankaflavin 能抑制肝癌細胞株 (HepG2) 生長與促進癌細胞凋亡，對於正常肺纖維母細胞 (MRC-5) 並不具傷害 (Su et al., 2005)。Monascin 則可抑制經高氧亞硝酸鹽 (peroxynitrite) 和紫外光 ultraviolet light B (UVB) 所誘發小鼠皮膚癌化的現象 (Akihisa et al., 2005a)。

橘色素 rubropunctatin 和 monascorubrin 具有良好抑菌效果 (Martinkova et al., 1995; Kono and Himeno 1999)。Monascorubrin 在致癌劑誘導老鼠腫瘤生成試驗 (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate, TPA-induced tumor promotion in mice) 模式中，亦發現其具有抑制 TPA 所誘發的皮膚癌化現象 (Akihisa et al., 2005b; Yasukawa et al., 1994; Yasukawa et al., 1996)。

本研究室先前曾以 *Monascus purpureus* NTU 568 菌株，針對不同基質進行發酵條件與二次代謝產物生成的探討，研究結果顯示，以山藥取代傳統米類發酵，具有較高的黃色素生成量。在誘發倉鼠高血脂與高膽固醇的動物模式中亦發現，紅麴山藥發酵產物只需紅麴米的 0.5 倍劑量，即可有降低血液中血脂與膽固醇的含量 (Lee et al., 2006b; Lee et al., 2007a)。

### 3. 神經傳導與降血壓物質 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)

$\gamma$ -胺基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 是一種中樞神經抑制性傳導物質，為 L-glutamate 經 glutamate decarboxylase 進行脫羧作用 (decarboxylation) 後所得的產物。在生物體中，GABA 會與 receptor-GABA<sub>A</sub> 結合，增加突觸後膜的氯離子的傳導而抑制突觸後電位，降低末梢神經的敏感度，因此，當血管過度收縮引起高血壓時，GABA 能抑制神經衝動，有效控制血壓的上升。

文獻指出，紅麴米所含之 GABA 經動物實驗證實具降低血壓之功效 (Kohama et al., 1987; Lai et al., 1988)。而本實驗室以 *Monascus purpureus* NTU 568 菌株發酵所得之高 GABA 產量紅麴山藥餵食先天性高血壓鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 亦得相同結果 (Wu et al., 2009)。GABA 除了能有效降低血壓外，亦有許多報導指出 GABA 具有抗焦慮與憂鬱 (Kalueff and Nutt, 2007) 以及抗癲癇的效果 (Meldrum, 1975)。

### 4. 抗氧化物質 (dimeric acid)

日本學者 Aniya 於 1999 年率先提出紅麴具抗氧化能力，他們發現 *Monascus anka* 發酵萃出物中含有具清除  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基及抗油脂過氧化性質的能力的 dimeric acid，並由 acetaminophen (AAP) 所誘發肝壞死 (hepatic necrosis) 的動物模式證實，*M. anka* 發酵萃出物能增加 glutathione-s-transferase (GST) 的活性，減輕化學藥劑對於肝臟的傷害，預防肝

臟的損傷 (Aniya et al., 2000; Aniya et al., 1999; Aniya et al., 1998)。

Dimerumic acid 的抗氧化機制為提供電子使得氧化物還原，而本身氧化成為 nitroxide radical，接著 nitroxide radical 會再被清除，經一連串的氧化還原循環使得  $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{O}^2$ 、alkyl radical、alkoxyl radical 和 peroxy radical 得以清除並抑制微粒體 (microsomes) 之脂質過氧化 (lipid peroxidation; LPO)，而達到抗氧化的效果 (Taira et al., 2002)。

## 5. 橘黴素 (citrinin)

橘黴素 (citrinin)，分子式  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_5$ ，分子量 250.25，為一種橙黃色的結晶物，微溶於水，可溶於極性有機溶劑及稀鹼溶液。為紅麴發酵所產生的代謝產物，具有抑制食品腐敗菌 *Bacillus*、*Streptococcus* 及 *Pseudomonas* 生長的作用 (Sankawa et al., 1983)。

動物實驗顯示 citrinin 對肝臟與腎臟的傷害力極大 (Hiroyuki et al., 1987)。深入探討後發現 citrinin 會抑制呼吸鏈上的 ATPase 及 pyruvate dehydrogenase、malate dehydrogenase、glutamate dehydrogenase、2-oxoglutarate dehydrogenase 等脫氫酶的活性，影響粒線體中電子傳遞鏈 (mitochondria electron transport chain) 的進行與改變膜電位 (membrane potential)，最終導致肝、腎細胞的粒線體功能受損 (Chagas et al., 1992a; Chagas et al., 1992b)。

## 二、放射線治療 (radiotherapy, RT)

癌症治療一直是各國研究學者與社會大眾所關心的議題，現行的癌症治療主要以外科手術 (surgery)、化學治療 (chemotherapy) 和放射線治療 (radiotherapy) 為主 (Simpson and Galanis, 2006)。外科手術屬於侵入性治療，對於患者來說風險性較高，因此，現階段癌症治療以化學治療和放射線治療較被大眾所接受。根據統計，臨床上約有超過 60% 的癌症患者須接受放射線治療 (Marple et al.,

2003)。

### (一) 放射線之分類

放射線依其射源的不同主要可分為內在射源 (internal radiation source) 和外在射源 (external radiation source) 兩大類。由放射性同位素本身所釋放出之放射線稱為「內在射源」，例如：近接治療機、鈷-60 治療機、伽瑪刀、核子醫學診斷所用之全身正子攝影等。「外在射源」則是指運用人為的方式製造高速射線撞擊金屬靶，而產生之放射線，如：X 光機、直線加速器、光子刀、螺旋刀和迴旋加速器等。

依特性分類放射線可分為粒子射線 (particle beam) 和光子射線 (photon beam) 兩大類。「粒子射線」依質量與電荷大小的不同可以再細分為輕粒子射線 (light-charged particle) 和重粒子射線 (heavy-charged particle) 兩種；放射線治療所使用的直線加速器所產生的電子射線屬於輕粒子射線，由於穿透力較差，適合淺層腫瘤的治療。而重粒子射線則因質量較重電荷較大，需要較強功率的迴旋加速器才能將其推近至光速，因此稱為重粒子射線。至於「光子射線」為一種不可見光，沒有質量且速度快為其特性，因此稱為光子射線，常見的有：X 光和  $\gamma$  射線。

### (二) 放射線治療之原理

放射線治療係利用高能量的放射束，破壞癌細胞細胞核中的 DNA、細胞膜或粒線體，使其不再繼續生長或改變其代謝方式而不再對身體具有破壞力 (Olive, 1998)。根據文獻報導，每 gray (Gy) 的放射線劑量會造成細胞中 3000 個鹼基對受損、1000 個單股 DNA 與 40 個雙股 DNA 斷裂 (Ward, 1994)。

放射線破壞癌細胞的原理在於放射線會裂解水分子 (radiolysis) 產生活性氧屬 (reactive oxygen species, ROS) 或活性氮屬 (reactive nitrogen species, RNS) 等

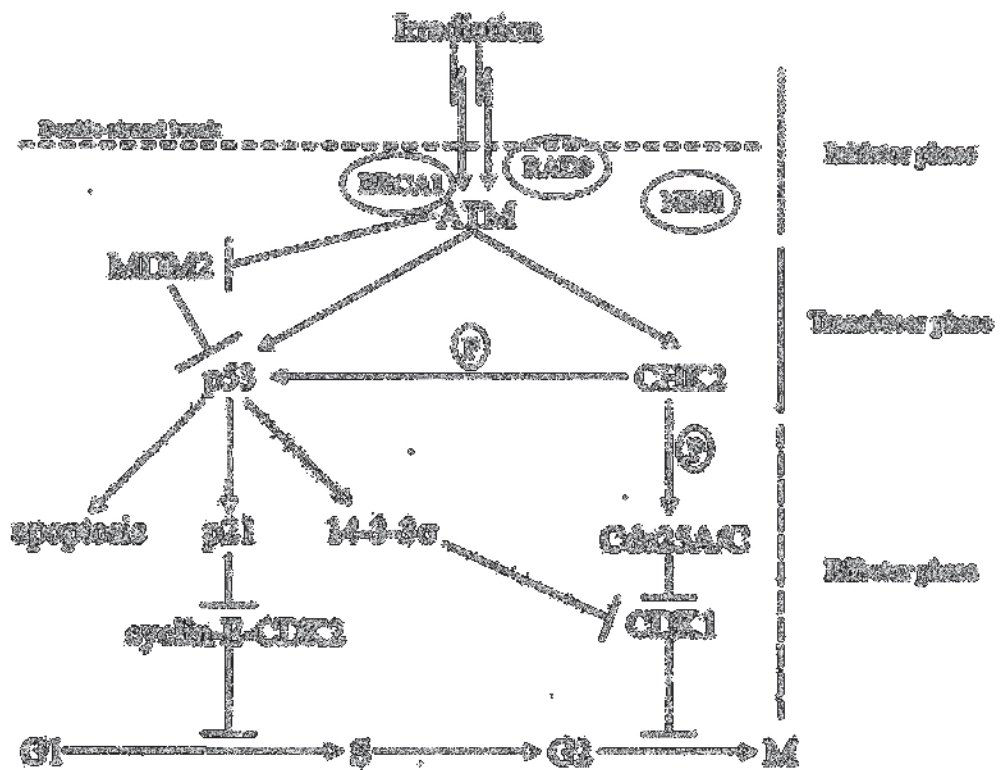
自由基 (free radicals)。它們會攻擊細胞核中的 DNA 使 DNA 雙股或單股斷裂，啟動細胞內 DNA 修補 (DNA repair) 機制，使得 ATM/ATR (ataxia telangiectasia mutated, ATM; ATM-Rad3-related, ATR) 訊息傳遞路徑活化 (圖 2-2)，磷酸化 (phosphorylation) p53 蛋白，使細胞週期停滯 (cell cycle arrest) 在 G1/S 或經由活化 CHK2 (cell cycle checkpoint kinase 2) 蛋白使得細胞週期停滯於 G2/M (Pawlik and Keyomarsi, 2004)，同時刺激 DNA 修補酵素表現量增加 (Yoshida et al., 2006)，亦會促進細胞凋亡訊息的傳遞，誘使細胞死亡相關基因的表現 (Szumiel, 1998)。造成細胞功能失調、細胞膜通透性的破壞、細胞分裂延遲、細胞週期停滯與細胞突變等 (Haas-Kogan et al., 1996; Yao et al., 2003; Fournier and Taucher-Scholz, 2004; Koshikawa et al., 2005)。

### (三) 放射線治療衍生的副作用 (side effects)

放射線雖然對於癌症有良好的治療效果，但在放射線治療過程中，隨著治療部位的不同，所產生的副作用也不相同。頭頸部的放射線治療，會破壞唾液腺與口腔黏膜細胞，使得唾液分泌異常，導致進食疼痛或食慾下降，嚴重影響病患心理，長期則會發生厭食症 (anorexia)；腹部放射線治療，會因放射線對於腸道細胞的刺激，促使腸道細胞不正常增生或走向凋亡 (Withers, 1971; Potten, 1990; Bowen et al., 2006; Goldman, 1997; Ramachandran et al., 2000) 使得消化酵素分泌異常，產生消化不良或影響食物吸收的情況，長久下來會導致營養缺乏。癌症病患若長期處於營養缺乏的情況下，會出現體重下降與肌肉、脂肪組織逐漸耗損等情況 (潘與王, 2003)，不但影響癌症治療的效果，最終更會演變為癌症惡病質 (cachexia) 使得死亡率提升。

美國學者 Okunieff 將放射線對於生理的影響分為立即性反應 (immediate responses)、早期毒性反應期 (early phase of toxicity and responses) 與晚期毒性反應期 (late phase of toxicity and responses) 三個階段 (圖 2-3) (Okunieff et al.,

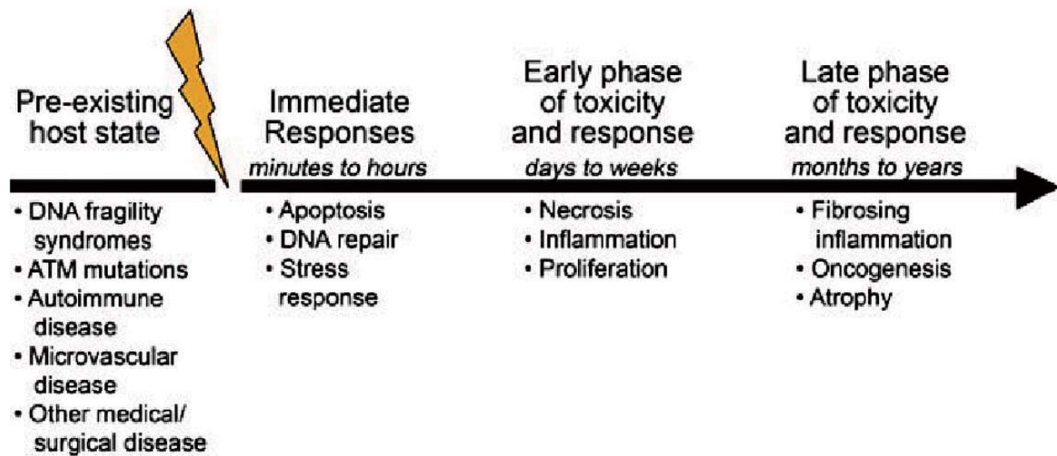




(Pawlik and Keyomarsi, 2004)

圖 2-2 DNA 損傷訊息傳遞路徑

Fig. 2-2 Simplified model of the core signaling pathways induced by DNA damage.



(Okunieff et al., 2008)

圖 2-3 放射線衍生效應之進展過程

Fig. 2-3 Development and progression of radiation-induced late effects.

2008)。立即性反應主要是 DNA 損傷 (DNA damage) 與細胞凋亡 (apoptosis)，通常發生在放射線照射後的數分鐘到數小時之間；在數天到數週之間則稱為早期毒性反應，此階段的生理反應主要是放射線所導致的細胞壞死 (necrosis)、細胞發炎 (inflammation) 與細胞增生 (proliferation) 為主；如果發炎反應持續進行，經過數個月以後則會進入晚期毒性反應期，受放射線照射的部位會逐漸纖維化 (fibrosis) 甚至產生癌化 (oncogenesis) 的現象。

### 1. 放射線引起的發炎反應

發炎反應為目前放射線治療中最主要的生理反應。近年來許多研究報告皆指向組織的慢性發炎反應被認為與癌症的產生有關 (Balkwill, 2004)。主要原因包含：一、發炎過程中的過氧化物與自由基會導致基因的突變 (Jackson and Loeb, 2001)。二、腫瘤細胞在癌化過程中會轉型為能利用發炎反應分子的形式 (Lazar-Molnar et al., 2000)。三、發炎反應分子與腫瘤的促血管新生能力和轉移侵襲之能力具有高度的相關性 (Offersen et al., 2002; Matsuo et al., 2004)。

放射線治療時，會促使腫瘤周邊的上皮細胞 (epithelium cells)、內皮細胞 (endothelial cells)、纖維母細胞 (fibroblasts) 與巨噬細胞 (macrophage) 大量分泌腫瘤壞死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、介白素-1 (interleukin-1, IL-1) 和介白素-6 (interleukin-6, IL-6) 使得血管通透性增加而導致紅、腫、熱、痛等發炎反應，且持續刺激活化巨噬細胞以分泌更多的促發炎的細胞激素 (Nathan, 1987)。TNF- $\alpha$  是最早期被誘發的調節因子，可以誘導單核白血球及巨噬細胞分化、活化巨噬細胞、刺激補體及凝血系統；IL-1 為介白素家族 (interleukin family) 的一員，包括：IL-1 $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  兩種形式，與 TNF- $\alpha$  共同調控急性期反應 (Ramadori and Armbrust, 2001)。微量的 IL-1 $\beta$  主要生物功能是當做局部發炎的媒介物，特別是刺激單核巨噬細胞和血管內皮細胞分泌更多 IL-1 $\beta$ ，並誘發合成 IL-6 (Mastruzzo et al., 2002)；IL-6 屬多功能之細胞激素，功能包括誘導急性期蛋白質之合成、增加體溫、刺

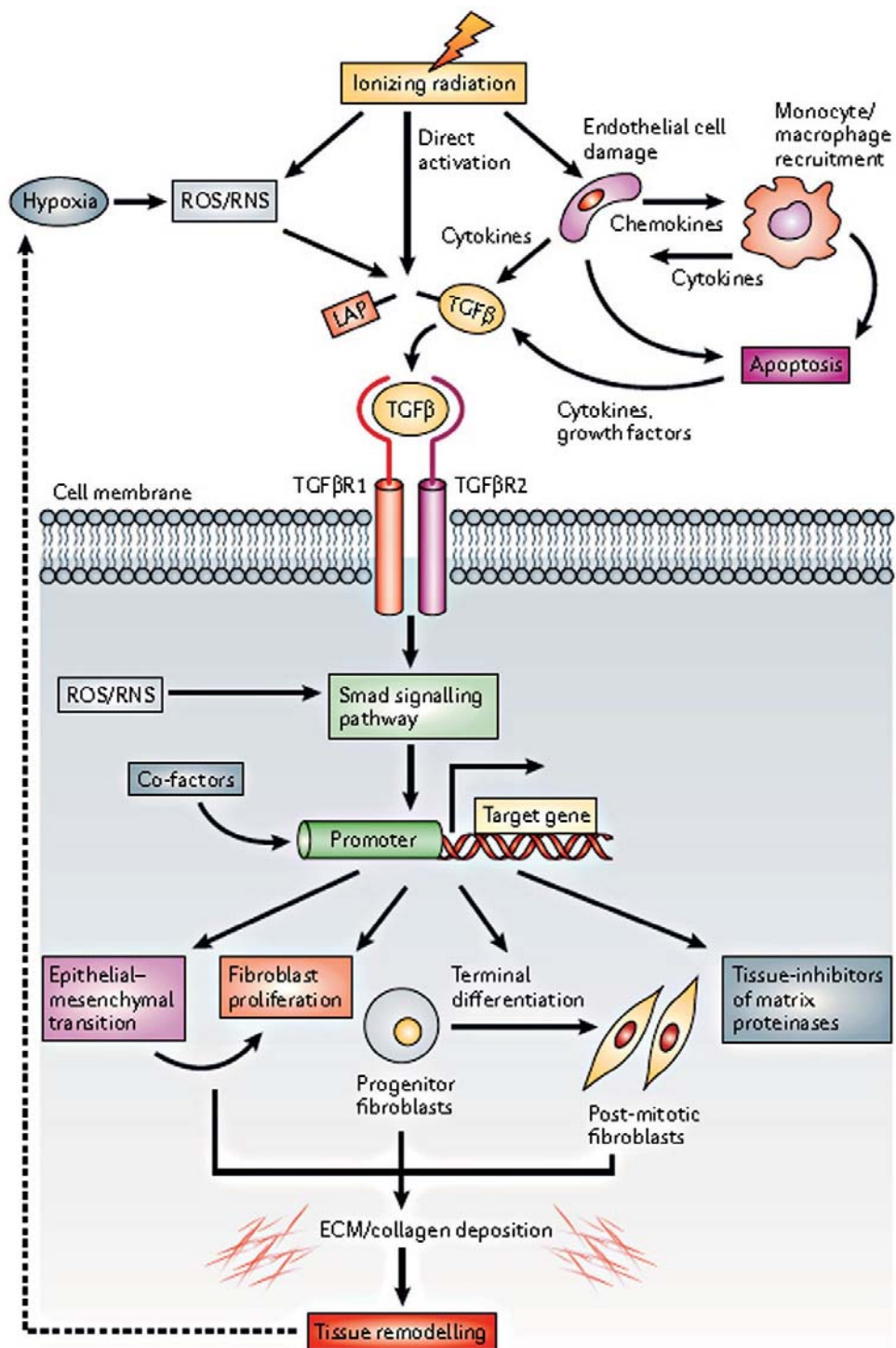
激 T 細胞的活化及刺激 B 細胞產生抗體。

文獻指出，接受完肺部放射線治療後的小鼠，能於肺部組織偵測到 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 等促發炎激素的大量表現，產生放射線肺炎 (radiation pneumonitis, RP) 的症狀，長久下來會演變為肺纖維化，造成肺部功能不可逆的損傷 (Rube et al., 2005; Chen et al., 2001; Chen et al., 2005)。此外，促發炎激素 IL-6 除了能透過誘發抗凋亡分子 Mcl-1 使癌細胞更具抗凋亡能力，也具有誘發血管內皮細胞生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 增強腫瘤血管新生的能力 (Wei et al., 2001; Wei et al., 2003)。亦有報導指出，癌症治療過程中引起的發炎反應與癌症惡病質 (cachexia) 具有高度相關性 (Dulger et al., 2004; Trikha et al., 2003; Zaki et al., 2004)。但若刻意的增強免疫反應反而利於腫瘤血管新生 (Chen et al., 2003)。

## 2. 放射線引起的纖維化反應

放射線除了會引發組織發炎以外，纖維化 (fibrosis) 亦是放射線治療晚期常見的副作用。放射線之所以會導致組織纖維化其機制為放射線會直接活化或經由 ROS/RNS 途徑亦或是內皮細胞損傷刺激巨噬細胞途徑活化轉型生長因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )，使得 TGF- $\beta$  結合到 TGF- $\beta$  受體 (TGF- $\beta$  receptor) 上，啟動下游 smad 訊息傳遞路徑，影響下游基因的調控，導致纖維母細胞不正常的增生 (fibroblast proliferation)，胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 與膠原蛋白 (collagen) 的沉積，最後產生纖維化的現象 (圖 2-4) (Bentzen, 2006)。

TGF- $\beta$  為一種多功能蛋白，在哺乳動物中，TGF- $\beta$  分為 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3 三種亞型，它參與組織再生、細胞分化、胚胎發育和免疫反應。研究指出，於癌化細胞大量表現 TGF- $\beta$  會促進原位癌 (carcinoma *in situ*) 發展成為侵襲癌 (invasive carcinoma) (Gladskikh et al., 2004; Glick, 2004; Wilkins-Port and Higgins, 2007)。亦有研究報告指出，放射線治療後 IL-1 $\beta$  和 IL-6 大量表現所引起的發炎反應，會刺激 TGF- $\beta$ 1 的活化，使得胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 與膠原



(Bentzen, 2006)

圖 2-4 放射線纖維化的關鍵過程

Fig. 2-4 Key processes in radiation fibrogenesis.

蛋白 (collagen) 沉積，導致組織產生纖維化的現象 (Chen et al., 2001; Chen et al., 2005)。

### 3. 放射線引起的血管新生

血管內皮細胞生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 為血管新生 (angiogenesis) 的重要指標。早在 1971 年 Folkman 學者便已提出單靠腫瘤細胞周邊的養份並不足以維持腫瘤生長所需，必須藉由新生血管來運輸養分才能維持腫瘤的生長，如果沒有新生血管生成，腫瘤細胞將停止生長並且走向死亡 (Folkman et al., 1971)。直到 1989 年，Leung 學者才證實腫瘤在微氧 (hypoxia) 環境下，會分泌 VEGF 刺激血管新生 (Leung et al., 1989)。

文獻指出，以放射線處理小鼠肺癌細胞株 (Lewis lung carcinomas, LLCs) 以及以人類腺癌細胞株 (esophageal adenocarcinoma, Seg-1)、人類鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma, SQ20B)、人類腦神經膠質瘤 (glioblastomas, T98 and U87) 和人類黑色素細胞瘤 (melanoma, U1) 所建立的小鼠荷瘤模式中發現，放射線會激發腫瘤細胞大量分泌 VEGF 導致腫瘤血管新生，降低腫瘤對於放射線的敏感度 (Gorski et al., 1999)。以放射線照射人類神經膠質瘤細胞株 U251、U251-NG2 和 U87 亦發現放射線所誘發腫瘤細胞產生的 VEGF，會導致腫瘤細胞對放射線產生抗性 (radioresistance) (Hovinga et al., 2005)。最新研究報導亦顯示，TNF- $\alpha$  在 TAM 產生 VEGF 過程中扮演重要的角色，以腫瘤相關巨噬細胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 所建立的動物模式中發現，放射線刺激 TAM 產生 VEGF 需要完整的 TNF- $\alpha$  訊息傳遞，如果阻斷小鼠 TNF 受體 (tumor necrosis factor receptors 1 and 2, TNFR1,2-/-) 或 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha, TNF-/-)，會使得 TAM 無法分泌 VEGF 而增強放射線對於腫瘤的毒殺效果 (Meng et al., 2010)。

### 三、研究目的與大綱

放射線治療在臨床癌症治療上，一直扮演著重要的角色。儘管放射線治療的效果良好，但仍然會對正常組織產生傷害，嚴重影響治療效果，如何減少放射線治療產生之副作用，成為臨床與基礎研究上迫切探討的問題。

紅麴為中國傳統的食品與中藥材，已知具有良好降膽固醇、降血脂、抗氧化、抗發炎與抗腫瘤的功效。文獻上，有關於紅麴在醫學領域上的研究雖然眾多，但多以抗腫瘤、促進癌細胞凋亡與抗腫瘤轉移為研究方向，對於紅麴應用於癌症治療所衍生相關副作用方面，並未有太多琢磨。

因此，本研究主要目的為以紅麴山藥酒精萃取物 (ethanol extract of red mold dioscorea, RMDE)，對於放射線治療所衍生相關副作用進行探討，瞭解是否具緩解副作用效果。實驗以動物實驗為主，細胞實驗為輔，實驗架構詳見圖 2-5。在動物實驗方面，以 B16 黑色素細胞瘤荷瘤小鼠 (B16-bearing mice) 建立臨床放射線治療模式，研究紅麴山藥酒萃物與放射線治療所引起相關副作用之關係。在細胞實驗方面，則以動物實驗所得之結果為基礎，深入探討紅麴山藥酒萃物中之功效成分 ankaflavin、monascin 和 citrinin 在緩解放射線治療衍生副作用中所扮演的角色。

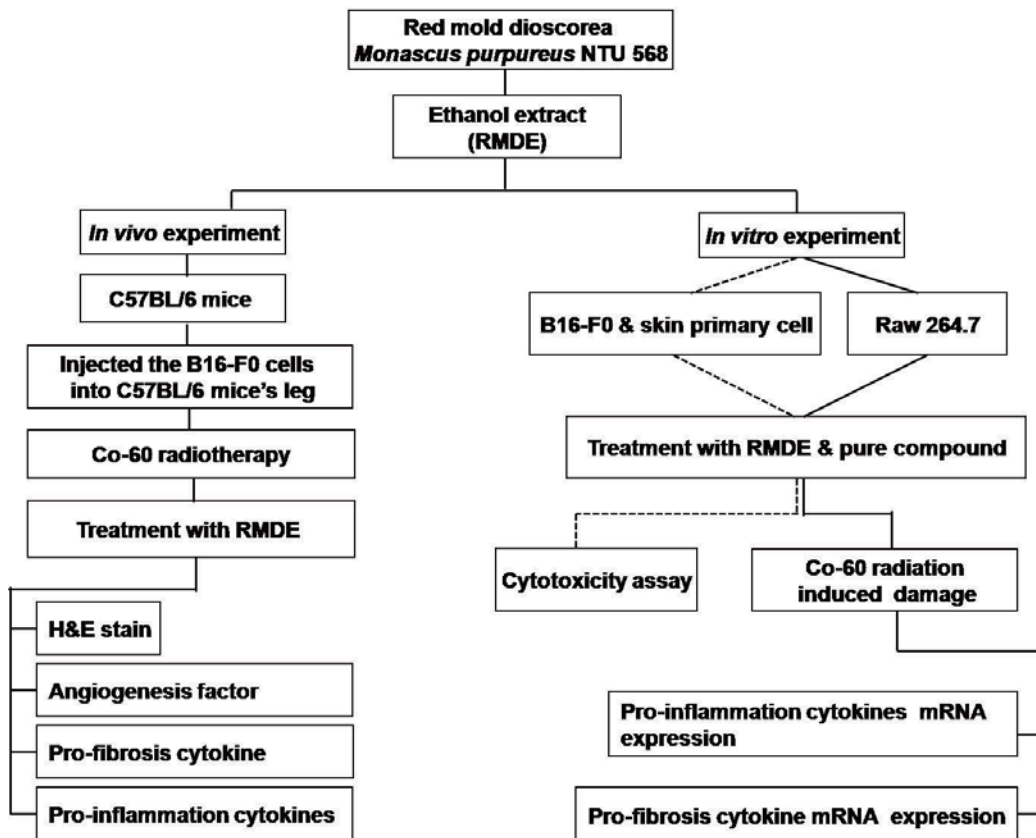


圖 2-5 本論文研究大綱

Fig. 2-5 The outline of this study.



### 第三章 材料與方法

#### 一、實驗材料

##### (一) 常用儀器

1. 無菌操作台 (Kansin Co., Taipei, Taiwan)
2. 二氧化碳培養箱 (Model RCO3000TABB, Revco Technologie, Ayheville, NC, USA)
3. 恆溫水浴槽 (Water bath) (Model DB, Deng Yng Co., Taipei, Taiwan)
4. 倒立式顯微鏡 (ECLIPSE TS100, Nikon Co., Tokyo, Japan)
5. 數位相機 (COOLPIX5200, Nikon Co., Tokyo, Japan)
6. ELISA reader (Thermo Labsystem, Beverly, MA, USA)
7. pH 測定器 (Model 6071, Jenco Co., San Diego, CA, USA)
8. 分光光度計 (Spectrophotometer) (Model U-2001, Hitachi Co., Tokyo, Japan)
9. 黴菌操作箱 (Kansin Co., Taipei, Taiwan)
10. 恆溫振盪培養箱 (Orbital incubator shaker) (Model 717, Hotech Co., Taipei, Taiwan)
11. 烘箱 (DK500, 智勤, 台北, 台灣)
12. 純水製造機 (Ultrapure water system) (Millipore Co., Molsheim, France)
13. 殺菌釜 (Autoclave) (Model SS-320, Tomy Co., Tokyo, Japan)
14. 離心機 (Himac CR-21, Hitachi Co., Tokyo, Japan)
15. 超高速離心機 (GS-15R, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)
16. HPLC 層析幫浦 (PU2089 plus, Jasco Co., Tokyo, Japan)
17. HPLC 紫外光偵測器 (UV detector) (UV2075 plus, Jasco Co., Tokyo, Japan)
18. HPLC 螢光偵測器 (Fluorescence detector) (FL-1, Rainin Co., Wobum, MA,

USA)

19. HPLC C18 層析管柱 (C18 column): Discovery@ C18 column, 25 cm x 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m (Bellefontia, PA, USA)
20. X 光影像系統 (DF211-H, TOSHIBA Co., West-Sussex, UK)
21. PCR 反應系統 (ABI 2720, Applied Biosystems Inc., Warrington, UK)
22. Co-60 照射器 (4700Ci Picker C-9, Picker Co., NY, USA; 臺大醫院腫瘤醫學部放射科)

## (二) 藥品與試劑

1. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、fecal bovine serum (FBS) 及 Penicillin-Streptomycin 購自 HyClone Laboratories (Logan, UT, USA).
2. Isopropanol、citrinin、calcium chloride、monacolin K、absolute alcohol、RNase A、Tween-20、ABTS Liquid Substrate Solution、acetate、phenol 和 chloroform 購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
3. PDA broth、peptone、tryptone、glucose、malt extract、Bacto-agar 購自 Difco Co. (Detroit, MI, USA)
4. Dimethyl sulfoxide (DMSO) 購自 Kanto Chemical Co. (Tyoko, Japan)
5. Ethyl acetate、crystal violet、chloroform 購自 E. Merck (Darmstadt, Germany)
6. Lovastatin 購自永信藥品工業股份有限公司 (台中, 台灣)
7. Ethanol (95%) 購自台灣菸酒股份有限公司 (台北, 台灣)
8. TRIzol<sup>®</sup>、SuperScript<sup>™</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit 購自 Invitrogen Co. (New York, CA, USA)
9. IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 VEGF ELISA kit 購自 PeproTech Inc. (London, UK)
10. TGF- $\beta$ 1 ELISA kit 購自 R&D system (McKinley Place, MI, USA)

### (三) 菌株與基質

本研究所使用之紅麴菌株為 *Monascus purpureus* NTU 568，此菌株為本研究室自行分離之高二次代謝產物菌株。發酵所用基質為 *Dioscorea batatas* Dence 品系之山藥，購自台灣超級市場。

## 二、實驗方法

### (一) 紅麴菌株之培養

將 *Monascus purpureus* NTU 568 菌株以 Potato Dextrose Agar (PDA) 培養基進行培養，待菌長滿整個培養皿後，挖取 1 cm<sup>2</sup> 大小之菌塊，接種於 5% 之滅菌在來米粉水中，於 30°C 培養 2 天備用。

### (二) 紅麴山藥之製備

將山藥塊洗淨並切成適當大小 (0.5 x 0.5 x 0.2 cm)，秤取 500 g 之山藥以麴布包起來，並將水瀝乾後進行高壓滅菌，置於滅菌操作箱冷卻至室溫後，即可進行接菌。取培養好的紅麴菌液，接種入滅完菌之山藥中，將菌液與山藥混合並攪拌均勻，置於木製之麴盤 (35 × 25 × 5 cm) 中，於 30°C 進行培養，培養期間須每天密切注意樣品之含水量，並適時做補水之動作，約 7 天後，可以看到山藥粒呈現鮮豔的橘紅色，即完成紅麴山藥之製備。

### (三) 紅麴山藥酒萃物之製備

將發酵完之紅麴山藥以 50°C 進行烘乾，乾燥完之紅麴山藥顆粒以磨粉機將其磨成細粉，進行酒精萃取。秤取 500 g 之紅麴山藥粉末，加入 3 L 的 95% 酒精 (ethanol) 於 37 °C 下萃取 24 小時，將萃取液以 0.22- $\mu$ m 濾膜過濾，並進行減壓濃縮，蒸餾所得之酒精倒回紅麴山藥渣中，再依上述條件反覆萃取三次後，將萃取物置於抽風櫥中使殘餘酒精揮發，即完成紅麴山藥酒萃物 (ethanol extract of

red mold dioscorea, RMDE) 之製備。

#### (四) 紅麴山藥酒萃物之成分分析

以 HPLC 法分析紅麴山藥酒萃物中之成分 (Lee et al., 2006c)，將紅麴主要功效成分 monacolin K、ankaflavin、monascin 和 citrinin 標準品稀釋成適當濃度，製作成標準曲線，標準曲線之 R 值須達 0.99，以內插法求得樣品濃度。

HPLC 分析條件如下：

Column - C<sub>18</sub> column

Mobile phase - water : acetonitrile : trifluoroacetate (450 : 550 : 0.5)

Flow rate - 1.0 mL/min

Detection - 螢光偵測器偵測 excitation  $\lambda_{\max} = 330$  nm, emission  $\lambda_{\max} = 500$  nm ; UV 偵測器偵測， $\lambda_{\max} = 238$  nm

#### (五) 動物實驗

##### 1. 動物飼養與照料

本研究所用動物購自財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心 C57BL/6 品系之四週齡公鼠。飼養空間之相對溼度為 60%，室溫  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照時間為 9:00~21:00 之 12 小時光照循環。每週測定飼料攝取量與體重，每兩天換一次飲水與墊料，並隨時維護動物房之清潔且保持安靜，且遵循行政院農業委員會動物飼養細則與規定 (行政院農委會中華民國 99 年 1 月 27 日修正之動物保護法 (Animal Protection Law))。

##### 2. 動物實驗分組與劑量之訂定

實驗動物分組如下：(a) 正常對照組 (normal control)、(b) B16-荷瘤對照組 (B16-bearing control)、(c) 低劑量 lovastatin 飲食組 (25 mg/kg/天)、(d) 高劑量

lovastatin 飲食組 (50 mg/kg/天)、(e) 低劑量紅麴山藥乙醇萃取物組 (100 mg/kg RMDE/天) 和 (f) 高劑量紅麴山藥乙醇萃取物組 (200 mg/kg RMDE/天)，共六組，每組 5 隻，共計 30 隻小鼠，詳細實驗日程如圖 3-1。

劑量選擇上，lovastatin 為市售紅麴中主要的功效成分之一，且經文獻證實具有抑制癌細胞生長與促進腫瘤細胞凋亡 (Mo and Elson, 2004; Shellman et al., 2005; Wong et al., 2002)、抑制癌細胞轉移 (Alonso et al., 1998; Nubel et al., 2004; Shibata et al., 2004; Ho and Pan, 2009) 和抗發炎 (Lefer, 2002; McCullough, 2001; Yeung and Tsao, 2002) 等功效。因此用來與紅麴山藥酒萃物組做對照，劑量係參考日本學者 Shibata 於 2004 年所發表之論文 (Shibata et al., 2004) 而訂定。

紅麴山藥酒萃物 d 至 f 組之劑量，係參考本研究室所發表之論文 (Ho and Pan, 2009) 加以修改後所訂定。此劑量依據美國藥物食品管理局 (Food and Drug Administration) 2005 年所發表的 Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers 文章中之人體與小鼠換算公式： $(\text{animal mg/kg dose} \times \text{animal } k_m) / \text{human } k_m = \text{human mg/kg dose}$ ；animal  $k_m=3$ 、human  $k_m=37$ ，求得每 100 mg/kg 之 RMDE 相當於 60 kg 成年人，每日攝取 8 mg/kg；200 mg/kg 之 RMDE 則相當於 60 kg 成年人，每日攝取 16 mg/kg。

### 3. C57BL/6 小鼠放射線治療模式之建立

係參考美國學者 Camphausen 於 2001 年所建立之 Lewis lung carcinoma-C57BL/6 小鼠 (LLC-LM) (Camphausen et al., 2001) 放射線治療模式，以 B16-F0 黑色素細胞瘤取代 LLC 細胞建立 B16-荷瘤小鼠 (B16 melanoma-bearing mice model)。將四週大的 C57BL/6 小鼠預養一週後，進行腫瘤注射。

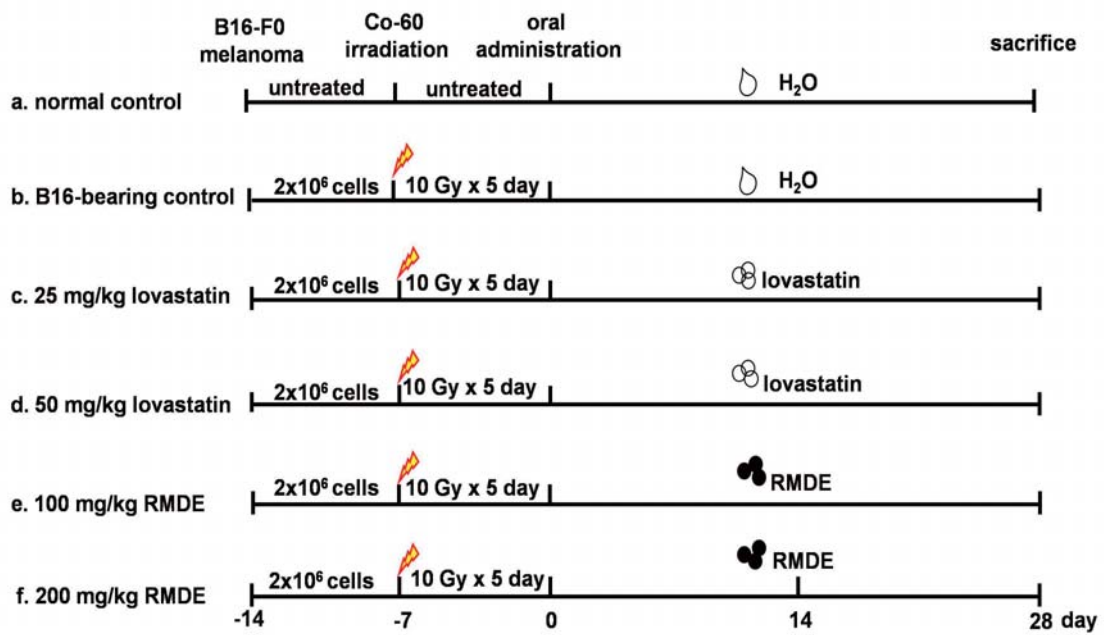


圖 3-1 動物實驗日程與組別

Fig. 3-1 The animal experimental schedule and groups.

B16-F0 細胞以  $2 \times 10^6$  細胞數懸浮於 50  $\mu\text{L}$  的 PBS，並以 1 mL 的注射針頭將其注射於小鼠大腿皮下組織，七天後（腫瘤長至 1200~1300  $\text{mm}^3$ ，圖 3-2A, B），進行放射線照射。

放射線療程所使用之放射線治療平台為國立臺灣大學附設醫院腫瘤醫學部放射科之放射線治療平台（圖 3-3 A），以 Co-60 所發出之伽瑪射線 ( $\gamma$ -ray) 為能量來源，使用劑量為每天 10 Gy，持續五天，總累積劑量為 50 Gy。照射前，先將小鼠固定於壓克力保定架上（圖 3-3 B），紅色虛線區域以鉛塊遮蔽，只露出腿部，防止放射線照射到身體，而影響小鼠排泄系統，接著將保定架置於圖 3-3 A 紅色箭頭處，即可進行放射線照射。

實驗期間每週記錄體重與腫瘤大小變化，並依照下列公式：腫瘤體積 = Tumor volume ( $\text{mm}^3$ ) =  $0.52 \times \text{length} \times \text{width}^2$  計算腫瘤大小 (Janik et al., 1975)，搭配台灣大學獸醫專業學院附屬動物醫院之 X 光影像系統，觀察腫瘤變化。實驗期間，每天密切注意小鼠情況，當小鼠產生呼吸急促且活動力下降、腫瘤過大而破裂、失溫或是嚴重腹積水的現象時，判定為實驗終點，立即以  $\text{CO}_2$  犧牲，秤重後取其臟器，浸泡於福馬林中固定隔夜，待日後分析。

#### 4. 實驗動物之犧牲 (sacrifice)

本實驗採用  $\text{CO}_2$  窒息法，將小鼠禁食 12 小時，並以  $\text{CO}_2$  進行犧牲，確認小鼠死亡後，進行解剖，並採集血液與臟器。

##### (1) 血液之採集

將小鼠固定在保麗龍板上，以針頭固定四肢，用鑷子將小鼠肚皮拉起並沿尿道口往頭部方向剪開，撥開腸道，將針頭以 30 度角插入肝門靜脈中進行血液採集，採集時需緩慢抽取，避免阻塞，採好之血液於  $4^\circ\text{C}$  存放 2 小時並以  $1,750 \times \text{g}$ ，離心 15 分鐘，取血清置於  $-80^\circ\text{C}$  儲存，待日後分析。

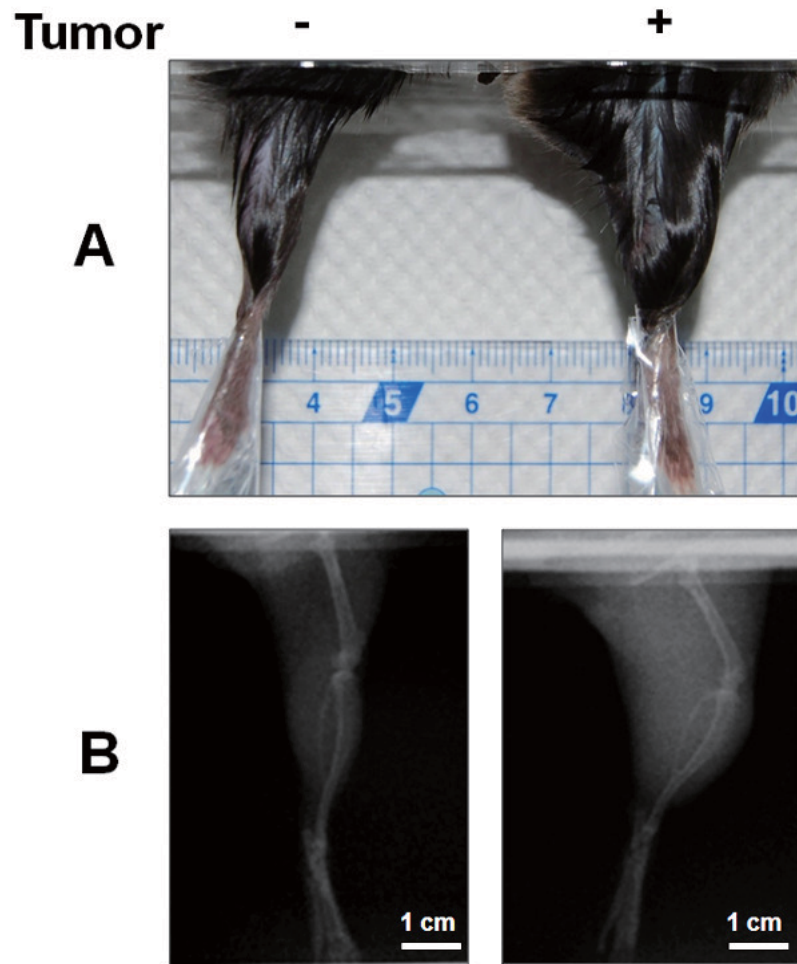


圖 3-2 A：正常鼠與腫瘤鼠比較圖；B：正常鼠與腫瘤鼠 X 光影像圖

Fig. 3-2 Comparison of normal mice and tumor mice (A); X-ray image of normal mice and tumor mice (B).



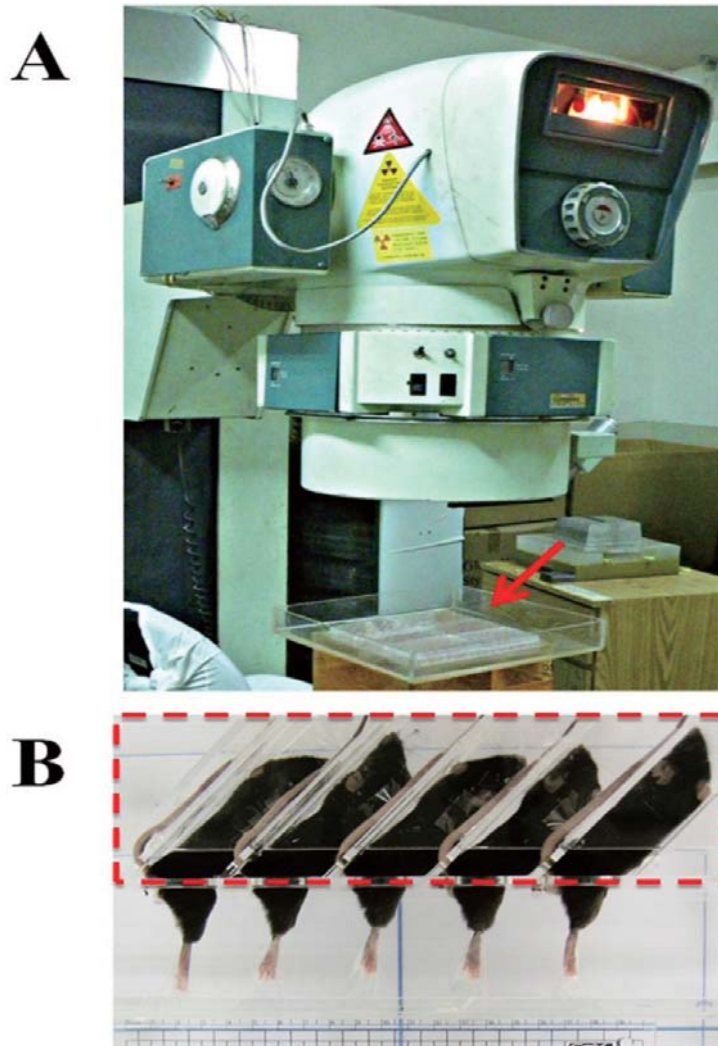


圖 3-3 A：放射線治療平台；B：小鼠保定情形

Fig. 3-3 Radiotherapy machine (A); Arrest of mice (B).

## **(2) 臟器之採集**

本實驗所採集之臟器為：肺、肝、腎和脾，肺部主要是要觀察是否有轉移現象，肝和腎為評估所使用之藥物劑量是否會對動物體造成毒害，脾臟則是觀察實驗過程對於免疫系統方面的影響，各臟器採集完後進行秤重，並以 1 X PBS 清洗後置於 3.7% 之中性福馬林進行固定化，方便日後切片分析。

## **(3) 組織切片 (Murice-Lambert et al., 1989)**

### **a. 組織固定 (fixation)**

將臟器取下後，以 1X PBS 清洗乾淨，浸泡於 3.7% 中性福馬林溶液中固定 24 小時，以 70% 酒精洗滌數次。

### **b. 石臘包埋 (paraffin embedded)**

以 80% 酒精作用 1 小時，80% 酒精作用 2 小時，90% 酒精作用 1 小時，移到新鮮的 90% 酒精再作用 2 小時，移到 100% 酒精作用 1 小時，再移到新鮮的 100% 酒精作用 2 小時，接著以 xylene 清洗組織，使脫水後的組織變的透明乾淨，置於石臘中以 60°C 浸泡 1 小時，再移到新鮮的石臘浸泡 2 小時，凝固後包埋成臘塊。

### **c. 石臘塊切片法 (paraffin block section)**

將石臘塊固定於迴轉式切片機 (rotary microtome) 上，將其切成 6  $\mu\text{m}$  的帶狀切片，將切片置於 45°C 水浴中，利用載玻片撈起切片置於玻片上，並置於 60°C 烘箱中，使其乾燥脫水，以備脫臘染色用。

### **d. 蘇木紫與伊紅染色 (Hematoxylin & Eosin staining, H&E)**

Hematoxylin & Eosin (H&E) 為一般組織切片常用之染色方法，Hematoxylin

為鹼性染劑，經氧化作用將細胞核染成藍色，Eosin 為酸性染劑，能將細胞質染成淡紅色，以此鑑別細胞核和細胞質。將烘乾後之切片置於 xylene 進行 2 次脫臘，每次 10 分鐘，將脫臘後的切片移置 100% 酒精下作用 2 分鐘藉此除去 xylene 溶液，並將酒精以梯度方式下降，達到復水之目的，將切片移置 90% 酒精中浸置 1 分鐘，80% 浸置 1 分鐘，50% 浸置 1 分鐘後，將玻片移到 Mayer's hematoxylin 溶液進行染色 35 秒，並以清水洗 5 分鐘，去除 Mayer's hematoxylin 溶液，接著再以 Eosin Y 做對比染色 5 秒，泡入 90% 酒精作用 2 分鐘，再移入 100% 酒精作用 5 分鐘，最後於 xylene 溶液中作用 10 分鐘，以達到完全脫水。

#### e. 封片

利用封片劑 (mounting reagent) 處理，使組織切片表面呈現透明有助於顯微鏡觀察。標本染色後，將 entellan-neu 充滿於組織切片，蓋上蓋玻片，並輕輕擦拭玻片，去除封片劑，於顯微鏡下觀察。

### 5. 血清促發炎激素 (IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ ) 分析

以 PeproTech 公司之 Murine ELISA Development Kit 依廠商所提供之標準測定流程進行 IL-1 $\beta$  (Cat. No. 900-K47)、IL-6 (Cat. No. 900-K50) 和 TNF- $\alpha$  (Cat. No. 900-M54) 測定。將 capture antibody (200  $\mu$ L/mL) 以 PBS 稀釋成 2  $\mu$ L/mL，每個 well 加入 100  $\mu$ L 之 capture antibody 稀釋液，室溫靜置過夜，隔日將 ELISA plate 倒乾，以 300  $\mu$ L wash buffer 洗四次，將 buffer 倒乾，每 well 加入 300  $\mu$ L block buffer，室溫靜置 1 hr，將 buffer 倒乾，以 wash buffer 洗四次，完成 plate 的製備。取 50  $\mu$ L sample 稀釋 2 倍，將 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  標準品稀釋成適當濃度，製作標準曲線，每個 well 加入 100  $\mu$ L 的 sample 和 standard，室溫靜置 2 小時，接著以 wash buffer 洗四次，將 detection antibody 稀釋成 0.5  $\mu$ L/mL，每 well

加入 100  $\mu\text{L}$ ，於 37°C 培養 2 小時，以 wash buffer 洗四次，將 avidin-HRP conjugate 稀釋 1:2000，每 well 加入 100  $\mu\text{L}$  avidin-HRP conjugate，室溫反應 30 分鐘，以 wash buffer 洗 4 次，每 well 加入 100  $\mu\text{L}$  ABTS liquid substrate，靜置待呈色後（時間依實驗調整），以 1% SDS 終止反應，於 405 nm 和 650 nm（校正）測吸光值，代入標準曲線，以內插法求得含量，並以蛋白質質量進行校正。

## 6. 血清纖維化指標 TGF- $\beta$ 1 分析

使用 R&D system 公司之 DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development System mouse TGF- $\beta$ 1 Kit (Cat. No. DY1679) 依廠商所提供之標準測定流程進行測定。先將樣品進行活化處理，取 40  $\mu\text{L}$  之血清與活化液 (2.5 N acetic acid/10 M urea) 進行混合，靜置 10 分鐘，再以 40  $\mu\text{L}$  的中和液 (2.7 N NaOH/1 M (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES)) 進行中和，即完成樣品之活化。

接著將 capture antibody (720  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) 以 PBS 稀釋成 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ，每個 well 加入 100  $\mu\text{L}$  capture antibody 稀釋液，室溫靜置過夜，隔日將 ELISA plate 倒乾，以 400  $\mu\text{L}$  wash buffer 洗二次，將 buffer 倒乾，每 well 加入 300  $\mu\text{L}$  block buffer，室溫靜置 1 小時，將 buffer 倒乾，以 400  $\mu\text{L}$  wash buffer 洗二次，完成 plate 的製備。接著將 TGF- $\beta$ 1 標準品稀釋至適當濃度，取 100  $\mu\text{L}$  的活化後樣品和標準品加入至包覆好抗體之 96 孔盤，於室溫靜置 2 小時，以 400  $\mu\text{L}$  wash buffer 洗二次，加入 100  $\mu\text{L}$  的 detection antibody (1:180)，靜置 2 小時，以 400  $\mu\text{L}$  wash buffer 洗二次，接著加入 100  $\mu\text{L}$  avidin-HRP conjugate (1:200)，靜置 20 分鐘，以 NeA-Blue TMB substrate (NeA-Blue tetramethylbenzidine substrate) 反應呈色，並以 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  終止反應，於 450 nm 下測其吸光值，代入標準曲線，以內插法求得含量，並以蛋白質質量進行校正。

## 7. 血清血管新生指標 VEGF 分析

使用 PeproTech 公司之 Murine ELISA Development Kit (Cat. No. 900-K99) 依廠商所提供之標準測定流程進行 VEGF 測定，方法與血清促發炎激素分析相同，於 405 nm 和 650 nm (校正) 測吸光值，代入標準曲線，以內插法求得含量，並以蛋白質質量進行校正。

## (六) 細胞實驗

### 1. 細胞培養

小鼠黑色素細胞瘤 B16-F0 (BCRC 60029) 與小鼠巨噬細胞 RAW 264.7 (BCRC 60001) 購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，小鼠皮膚初代細胞 (skin primary cell) 取自於財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心之 C57BL/6 小鼠，所有細胞皆培養於 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培養基中，內含 10% 胎牛血清 (FBS) 及 1% 三合一抗生素 (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 0.25 mg/mL amphotericin)，相對濕度 98%、37°C、5% CO<sub>2</sub> 的培養箱中，每 2-3 天進行繼代。

### 2. 細胞凍存

依據 Freshney 1994 之方法進行細胞凍存，凍存所使用之培養基為含 7% DMSO 之 DMEM，將細胞以 1X PBS 清洗 2 次後，加入 1 mL 0.25% trypsin-EDTA 置於 37°C 培養箱處理 1 分鐘，待細胞剝落後，以適量的 DMEM 終止反應，將培養基吸起，置於 15 mL 離心管以 700 x g 離心 5 分鐘，接著將培養基吸乾，置換成細胞凍存液，並進行分管 (1 mL/管)，置於細胞冷凍盒內，於 -80°C 冰凍 24 小時，換置於液態氮桶內進行保存。

### 3. 初代細胞之分離

用 70% 酒精將 C57BL/6 小鼠耳朵進行消毒，以無菌剪刀剪取一小片耳朵組

織，立即將其置於 37°C 之運送緩衝液 (0.9% NaCl + 56 mM glucose + 25 mM HEPES + 100 U penicillin/mL + 100 mg streptomycin/mL, pH=7.2)，迅速移至無菌操作台中，以滅菌過之剪刀將組織徹底剪碎 (操作時要適時滴入運送緩衝液，以保持組織濕潤)，將剪碎之樣品浸泡於 Krebs Ringer 溶液中 (5.6 mM glucose, 100 U penicillin/mL 與 100 mg streptomycin/mL)，於 37°C 水浴槽旋轉震盪培養 90 分鐘，震盪期間加入適當的 0.25% trypsin-EDTA 分解組織，以 800 x g 室溫離心 10 分鐘後，移除上層組織液，加入 DMEM 培養基，於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 進行培養。

#### 4. 細胞毒性試驗

為瞭解紅麴山藥酒萃物 (RMDE) 以及其所含純物質 ankaflavin、monascin 和 citrinin 對於黑色素細胞瘤 (B16-F0) 以及小鼠耳朵皮膚初代細胞 (skin primary cell) 之劑量效應，因此進行細胞毒性試驗。將樣品溶於 DMSO (dimethyl sulfoxide) 中，調整成適當濃度，使最後加入細胞培養基中之 DMSO 含量不超過 0.1%，細胞以  $1 \times 10^4$  cells/well 之密度接種於 24-well 盤中，於 37°C 培養 24、48 小時後，進行結晶紫染色 (crystal violet stain)。

結晶紫為一種亮紫色染劑，主要作用於細胞膜上，常用於分析貼附型細胞之生長與群落形成 (colony formation) 之比較，將適量結晶紫溶於 3.5% 中性福馬林中備用，將細胞以 1X PBS 清洗 2 次後，加入適量之染色液，一方面染色，一方面固定細胞，靜置 20 分鐘後，以清水清洗多餘染劑，並於通風處自然風乾，接著以 2% SDS (wt/vol) 溶液回溶，於波長 600 nm 測定吸光值，活細胞愈多，結晶紫含量愈多，吸光值亦愈高。比較實驗組與對照組的吸光值，換算成為百分比後，可反應細胞經 RMDE 以及其所含純物質處理後，對細胞生長速率與毒性之影響。

#### 5. 放射線誘導細胞發炎模式之建立

放射線誘導細胞發炎模式所選用之細胞為 Raw 264.7 小鼠巨噬細胞株，將

$3 \times 10^6$ /well 細胞接種於 6 well 中，培養 24 小時後，更換新鮮之 DMEM 培養基，使用臺大醫院腫瘤醫學部放射科之放射線治療平台，以放射源鈷六十為放射線能量來源，進行細胞之照射，將 well 以石蠟膜封口後，至於水盤中（水盤之目的為使放射能均勻散佈），以 0、0.5、1、2 和 4 Gy 進行照射，分別培養 0、0.5、1、2 和 4 小時，進行總 RNA 之萃取。

#### 6. 紅麴山藥萃取物與其純物質對於放射線誘發之發炎反應探討

為瞭解 RMDE 中，何種主要成分具有緩解因放射線所誘發的發炎反應，將  $3 \times 10^6$ /well 之 Raw 264.7 細胞接種於 6 well 中，待 12 小時細胞貼盤後，以 PBS 清洗 2 次，分別加入含有 2、4 和 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ankaflavin、monascin 和 citrinin 以及 15、30 和 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 RMDE 處理細胞 30 分後，以 2 Gy 之 Co-60 進行照射，照射完後於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養 1 (IL1- $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ) 和 4 (IL-6 和 TGF- $\beta$ ) 小時，進行總 RNA 之萃取，以探討紅麴山藥酒萃物與三種主要成分是否具減少因放射線所誘發之發炎反應。

#### 7. 總 RNA 之萃取

將處理完之細胞以 PBS 清洗 2 次，加入 1 mL 之 TRIzol<sup>®</sup> 反覆沖提細胞，待細胞完全 lysis 後，吸取溶液置於 1.5 mL 離心管中，冰浴 5 分鐘，加入 200  $\mu\text{L}$  chloroform 和 100  $\mu\text{L}$  2M acetate，震盪混勻 (vortex)，冰浴 3 分鐘，以 12900 g 離心 10 分鐘，待分層後，將上層水溶液吸到新的離心管，加入等體積的 isopropanol 後，置於  $-20^\circ\text{C}$  冰箱 1 小時，取出離心管，於  $4^\circ\text{C}$  下以 12900 g 離心 15 分鐘，再以 70% EtOH 清洗 2 次，於抽風櫥內晾乾 30 分鐘，以 10-20  $\mu\text{L}$  DEPC-treated water 進行回溶，即完成總 RNA 萃取，接著將樣品稀釋 250 倍，於  $\text{OD}_{260/280 \text{ nm}}$  進行測定，比值區間應落在 1.8-2.0 方為良好品質之 RNA。

## 8. 總 cDNA 之合成

將定量完之 RNA 以 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit 反轉錄為 cDNA。取 5 µg 之 RNA 加入 1 µL 之 50 mM oligo(dT)、1 µL 之 10 mM dNTP 和適量 DEPC-treated water，使總體積為 10 µL，於 65°C 反應 5 分鐘，冰浴 1 分鐘，再加入 2 µL 10X RT buffer、4 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub>、2 µL 0.1 M DTT、1 µL RNase OUT™、1 µL SuperScrip™ III RT，總體積為 20 µL，於 50°C 反應 50 分鐘，4°C 反應 10 分鐘，即完成 cDNA 的製備。

## 9. 引子 (primer) 之設計

本研究主要是針對 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 等促發炎激素與纖維化指標 TGF-β 探討紅麴山藥酒萃物與純物質是否具降低因放射線所引起之發炎與纖維化反應，各引子設計如表 3-1。

## 10. 聚合酶鏈反應 (polymerase chain reaction, PCR) 條件

以 cDNA 當作模板，進行 PCR，以便增幅目標基因。PCR 條件為 95°C 反應 10 min，進行 pre-denaturation，接著以 95°C 反應 30 sec、60°C 反應 30 sec 和 72°C 反應 30 sec 進行 35 循環使 cDNA 增幅，接著再以 72°C 反 10 min 讓 PCR 產物更完整，然後以 4°C 冰浴。

## 11. DNA 的洋菜膠體電泳分析

秤取 2 g 的洋菜膠 (agarose) 加熱溶解於 100 mL 0.5 X TAE 電泳緩衝液，(含 40 mM Tris-acetate 及 1 mM EDTA，以冰醋酸調整 pH 至 7.8)，使洋菜膠濃度為 2.0% (w/v)，待洋菜膠冷卻至 50 - 60°C 時，倒入鑄膠槽 (gel former)，並插上齒梳 (well comb)。等洋菜膠冷卻凝固後，小心取下齒梳，將洋菜膠放入水平式電泳槽，浸於 0.5 X TAE 電泳緩衝溶液中。



表 3-1 引子之設計

Table 3-1 primer design.

	Primer	Size (bps)
GAPDH	f: TGTGCAGTGCCAGCCTCGTC	212
	r: CGGCCTTGACTGTGCCGTTGA	
TNF- $\alpha$	f: ACTCCAGGCGGTGCCTATGTC	231
	r: CCTCCACTTGGTGGTTTGCTACGA	
IL-1 $\beta$	f: GCCAAGCTTCCTTGTGCAAGTGTC	264
	r: GTAGCTGCCACAGCTTCTCCACA	
IL-6	f: TCTGCAAGAGACTTCCATCCAGTTGC	242
	r: GACAGGTCTGTTGGGAGTGGTATCCT	
TGF- $\beta$ 1	f: AGGGTCTGGATCAGGTTTACCACTGC	277
	r: CACCAACCACAGCTGCGTCCATGT	

將欲分析的樣品與 1 倍染劑 (含 0.25% bromophenol blue、0.25% xylene cyanol 及 30% glycerol) 以 5:1 的比例混合均勻，再小心注入洋菜膠槽 (well)。接上電源，以電壓 50V/cm 進行電泳。

分離完畢後，取出洋菜膠，以 ethidium bromide (EtBr, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 染色 10 分鐘後，以水略為清洗，置於 100% 紫外燈下檢視染色帶的位置，並以 DNA 分子量標準品比對，以判定 DNA 分子的大小及濃度，各細胞激素分析結果以 GAPDH (housekeeping gene) 做校正，並以 Image J 軟體進行量化。

### (七) 生物統計分析方法

本研究所得之數據均以平均值  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SD) 表示。圖表結果以 SigmaPlot vs.10.0 軟體進行繪圖，電泳圖則以 ImageJ 軟體進行定量分析。統計分析所使用之軟體為 SPSS vs. 16.0，以單因子變方分析 (One-way ANOVA) 進行統計處理，各組之間差異性比較以  $p < 0.05$  表示具有顯著性差異。

## 第四章 結果與討論

### 一、動物實驗

#### (一) 紅麴山藥酒萃物對於放射線療程後小鼠體重與攝食量之影響

放射線治療過程中，病人會因放射線對於口腔黏膜與腸胃細胞造成的傷害，以及發炎反應所引起的身體不適，而產生厭食 (anorexia) 的情形，不僅影響食物的消化與吸收，更會產生營養缺乏、肌肉和脂肪組織逐漸耗損等情況，最終甚至會演變為癌症惡病質 (cachexia)，使得死亡率上升，由此可知，如何減少癌症病患因放射線治療衍生的食慾不振、消化吸收不良導致體重下降等情況，是一重要課題。

本實驗以 B16 荷瘤小鼠為研究模式，評估 RMDE 是否影響小鼠在放射線治療期間的體重與攝食量。由實驗結果圖 4-1 得知，在放射線治療期間，餵食低劑量與高劑量 RMDE 組，體重與正常控制組相當，餵食低劑量 lovastatin 組，體重接近 B16-荷瘤控制組，而餵食高劑量 lovastatin 組，體重較其他五組輕，各組在體重上並未達到顯著性差異，不過，對照腫瘤生長曲線圖 (圖 4-2)，餵食低劑量與高劑量的 RMDE 組別，腫瘤具有良好的控制，反觀 B16-荷瘤控制組與低劑量 lovastatin 組，腫瘤皆有復發現象，因此可推斷，B16-荷瘤控制組與低劑量 lovastatin 組，小鼠體重上升，應為腫瘤復發所致，而餵食低劑量與高劑量的 RMDE，則可提升小鼠在放射線療程後，體重上升至正常控制組之水平。

在攝食量方面，由圖 4-3 可以看出，第 0-7 天，各實驗組攝食量上均提升，且與正常控制組相當，顯示，放射線治療期間並不會對小鼠攝食量有所影響。但第 14 天起，由於放射線效力的減弱，各實驗組小鼠腿部腫瘤有復發及腹水的現象產生，導致小鼠活動力下降，以致各實驗組在攝食量上有所差異，當中 B16-荷瘤控制組，平均攝食量由第 14 天的 10.04 g，降至第 28 天的 8.40 g，共下降 1.64 g。顯示放射線治療後期所衍生的腫瘤復發、腹水和發炎反應，的確會影響

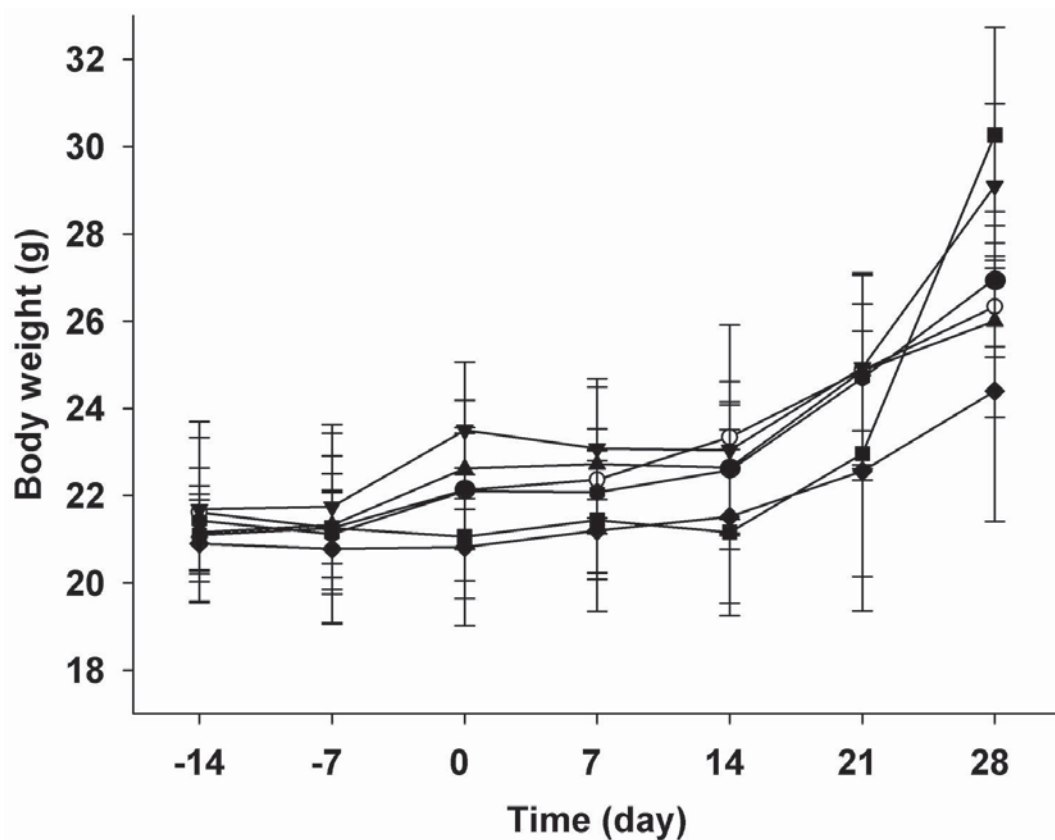


圖 4-1 實驗期間 C57BL/6 小鼠體重變化圖

正常控制組：○、B16-荷瘤控制組：▼、低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg)：■、低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)：◆、低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg)：▲ 和高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)：●。

Fig. 4-1 The body weight of C57BL/6 mice during test.

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD, n=5. Normal control: ○, B16-bearing control: ▼, 25 mg/kg lovastatin/day: ■, 50 mg/kg lovastatin/day: ◆, 100 mg/kg RMDE/day: ▲ and 200 mg/kg RMDE/day: ●.

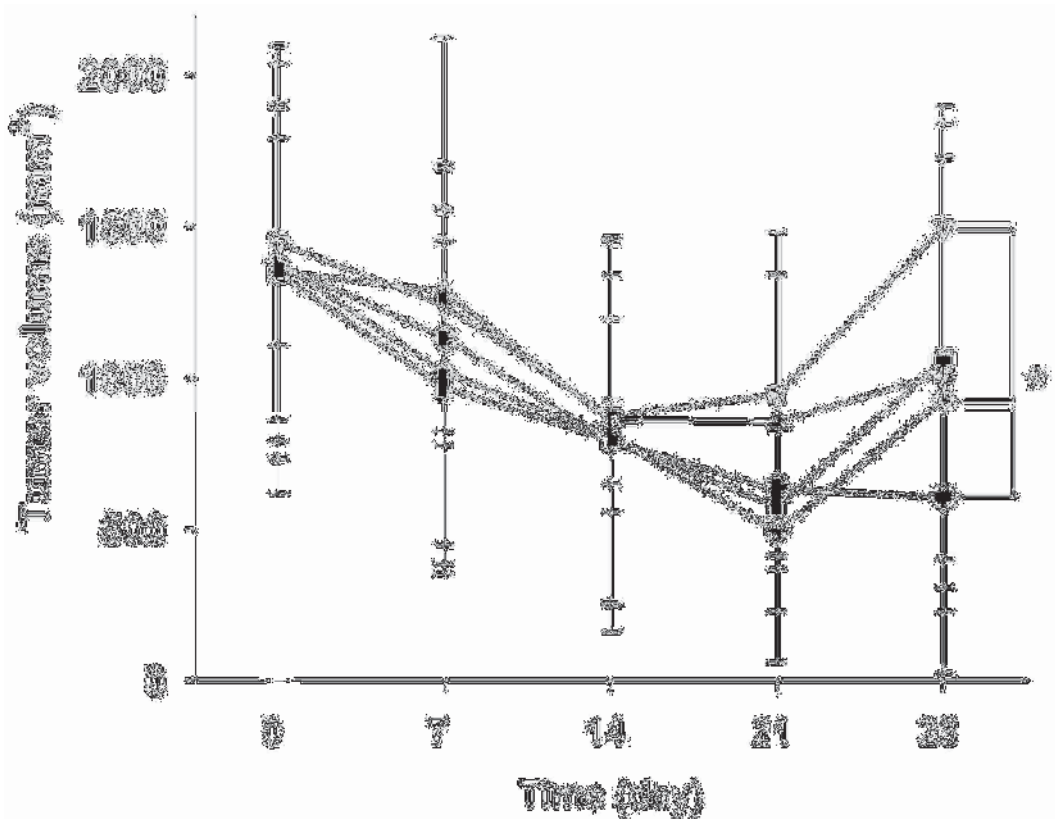


圖 4-2 不同時期 C57BL/6 小鼠腫瘤體積

B16-荷瘤控制組：▼、低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg): ■、低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)：◆、低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg)：▲ 和高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)：●。

Fig. 4-2 Tumor volume of C57BL/6 mice in difference phase.

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD, n=5. B16-bearing control: ▼, 25 mg/kg lovastatin/day: ■, 50 mg/kg lovastatin/day: ◆, 100 mg/kg RMDE/day: ▲ and 200 mg/kg RMDE/day: ●.

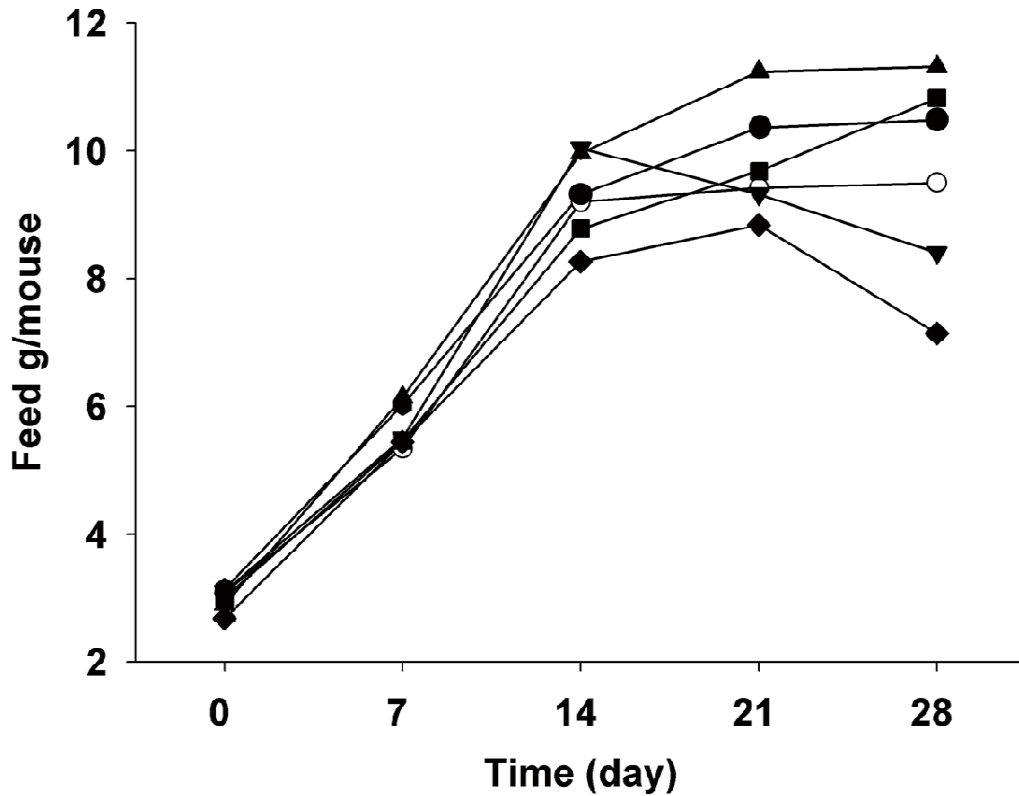


圖 4-3 實驗期間 C57BL/6 小鼠平均攝食量之變化

正常控制組：○、B16-荷瘤控制組：▼、低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg)：■、低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)：◆、低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg)：▲ 和高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)：●。

Fig. 4-3 The average daily intake of C57BL/6 mice during test.

Normal control: ○, B16-bearing control: ▼, 25 mg/kg lovastatin/day: ■, 50 mg/kg lovastatin/day: ◆, 100 mg/kg RMDE/day: ▲ and 200 mg/kg RMDE/day: ●.

小鼠的食慾。而高劑量 50 mg/kg 的 lovastatin 組，則於第 21 天開始，平均攝食量由原本的 8.84 g，至第 28 天的 7.14 g，共下降 1.70 g，由於 lovastatin 常見的副作用包括：頭痛、暈眩與腸胃不適，因此，推測高劑量的 lovastatin，使得小鼠產生上述症狀，進而影響攝食。至於低劑量的 lovastatin 與低劑量和高劑量的 RMDE 組，在第 28 天，平均攝食量分別為 10.82、11.32 和 10.48 g，與正常控制組的 9.50 g 相比，分別提高 1.32、1.82 和 0.98 g，顯示，餵食紅麴山藥酒萃物有助於提升小鼠在放射線療程後之攝食量，進而使得小鼠體重上升。

## (二) 紅麴山藥酒萃物對於放射線療程後小鼠腹水之影響

腹水是晚期癌症常見的臨床症狀之一，主要原因為治癒效果不佳，導致腫瘤轉移，使得微血管的通透性增加，富含蛋白質的細胞外液滲入腹膜腔，而產生腹水的現象。根據先前的經驗，小鼠在放射線治療後期，會產生嚴重腹水與失溫而導致死亡的情形。為了更進一步瞭解 RMDE 是否能減少小鼠在放射線治療後腹水的發生率，乃進行此實驗。於實驗期間，每天觀察小鼠身體狀況，並作記錄。

由圖 4-4 可以看出，各實驗組在第 21 天以前並無顯著差異，但第 21 天以後，陸續有小鼠產生嚴重腹水與失溫（圖 4-5）等現象。其中低劑量的 lovastatin 組為 1 隻小鼠，B16-荷瘤控制組和高劑量的 lovastatin 組則為 2 隻小鼠。截至第 28 天各實驗組小鼠未發生腹水數量分別為，正常控制組 5 隻、B16-荷瘤控制組 2 隻、低劑量的 lovastatin 組 2 隻、高劑量的 lovastatin 組 3 隻、低劑量與高劑量的 RMDE 則是各 4 隻，以 B16-荷瘤控制組和低劑量的 lovastatin 組腹水情形最為嚴重，共 3 隻，而低劑量與高劑量的 RMDE 則是與正常控制組相當，只有 1 隻，由此結果可以得知，lovastatin 的餵食，對於小鼠在放射線療法後之腹水發生率並不具影響，不論是餵食低劑量或高劑量的 RMDE，皆可有效降低小鼠在放射線療程後產生的腹水現象，達到與正常控制組相當之水平。

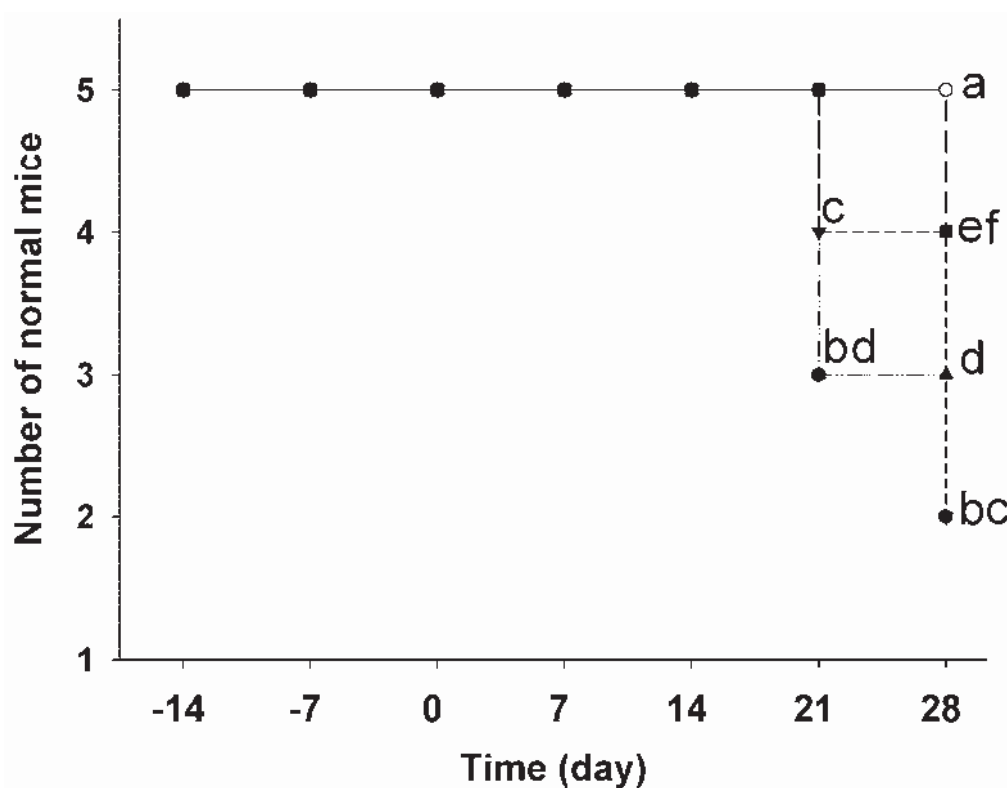


圖 4-4 C57BL/6 小鼠放射線療法後之腹水發生率

a. 正常控制組：○、b. B16-荷瘤控制組：▼、c. 低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg):  
 ■、d. 低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)：◆、e. 低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg)：  
 ▲ 和 f. 高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)：●。

Fig. 4-4 Results of ascites rate of C57BL/6 mice after radiotherapy.

TI: tumor injection; IR: irradiation. a. Normal control: ○, b. B16-bearing control: ▼, c.  
 25 mg/kg lovastatin/day: ■, d. 50 mg/kg lovastatin/day: ◆, e. 100 mg/kg RMDE/day:  
 ▲ and f. 200 mg/kg RMDE/day: ●; n=5.





圖 4-5 正常鼠與腹水鼠之比較

Fig. 4-5 Comparison of normal mice and ascites mice.

### (三) 紅麴山藥酒萃物對於放射線療程後小鼠腫瘤之變化

放射線雖然對腫瘤本身具抑制生長和毒殺的作用，但腫瘤細胞本身具有一連串的修復機制，能針對放射線引起的損傷，進行修復工作，因此放射線對於細胞的影響程度，會隨著時間的增加而消弱，使得腫瘤在放射線治療後期，有復發的情況產生。為了評估紅麴山藥酒萃物是否影響放射線治療後腫瘤之生長，實驗期間，每週觀察並記錄腫瘤之大小，於實驗結束後進行統計分析。

由腫瘤的 X 光影像圖 (圖 4-6) 和腫瘤量化圖 (圖 4-2) 可以看出，放射線照射後，隨著時間的增加，各組腫瘤皆有萎縮的現象。第 14 天，各組腫瘤平均大小約為 750~900 mm<sup>3</sup>，第 21 天開始，因為放射線的影響降低，以及腫瘤本身的適應，除高劑量 RMDE 組外，其餘四組皆有腫瘤復發的情況產生，結至第 28 天，各實驗組腫瘤大小分別為：B16-荷瘤控制組 1496.27 mm<sup>3</sup>、低劑量 lovastatin 組 1062.98 mm<sup>3</sup>、高劑量 lovastatin 組 933.44 mm<sup>3</sup>、低劑量 RMDE 組 1018.36 mm<sup>3</sup> 和高劑量 RMDE 組 606.21 mm<sup>3</sup>。當中，高劑量 lovastatin 組和高劑量 RMDE 組與 B16-荷瘤控制組具顯著性差異 ( $P < 0.05$ )；為了更進一步探討紅麴山藥酒萃物對於放射線治療後腫瘤之影響，於動物犧牲後，取其腫瘤組織進行 H&E 染色，由細胞型態學的角度進行觀察，結果 (圖 4-7) 顯示，除了 B16-荷瘤控制組以外，其餘各組在組織切片 (H&E stain) 上，皆發現腫瘤組織有大面積壞死之現象 (紅色箭頭處)，表示 lovastatin 與 RMDE 的處理，皆能破壞腫瘤細胞使其產生壞死的情況，由於本次實驗所使用之紅麴山藥酒萃物中，主要的功效成分為 monascin 和 ankaflavin，兩者在文獻中都被證實具有抗腫瘤生長與促進癌細胞凋亡等功效 (Su et al., 2005; Akihisa et al., 2005b; Yasukawa et al., 1994; Yasukawa et al., 1996)。因此，推測為 monascin 和 ankaflavin 兩種化合物的交互作用，抑制了腫瘤的復發以及誘使腫瘤細胞凋亡與壞死。綜合以上，紅麴山藥酒萃物的餵食，確實能降低放射線療程後腫瘤的復發，以及促進腫瘤細胞的壞死。

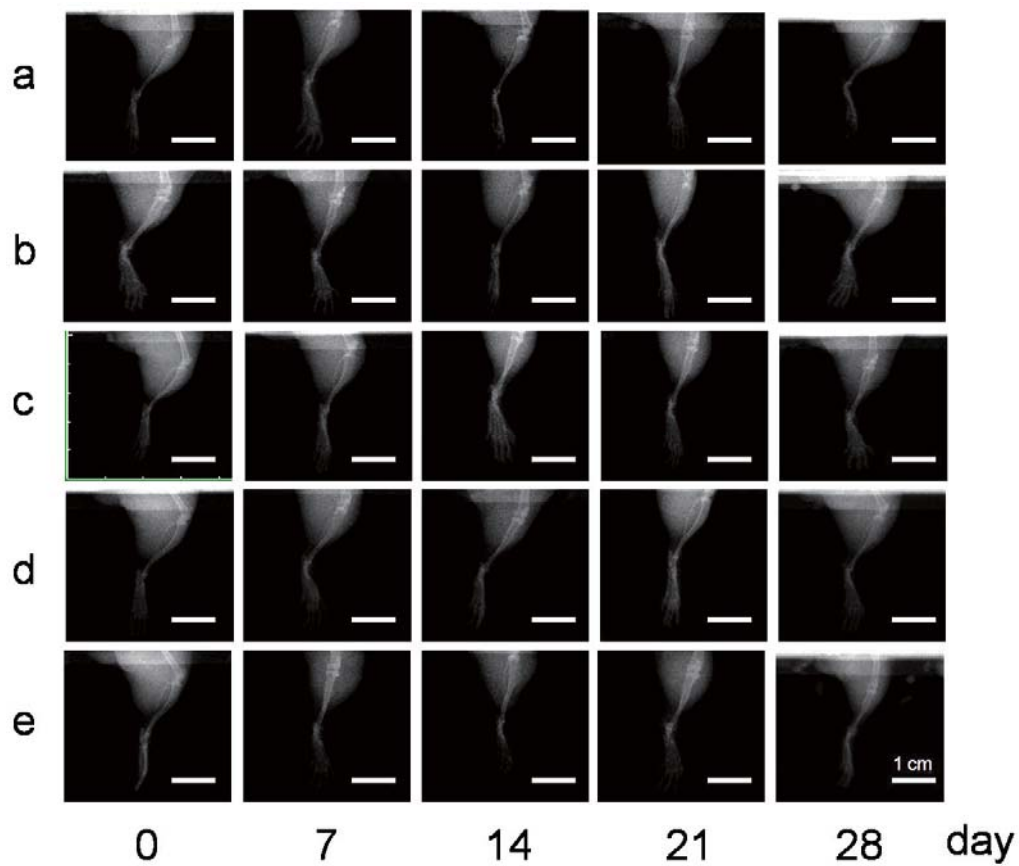


圖 4-6 不同時期 C57BL/6 小鼠腫瘤 X 光影像圖

a. B16-荷瘤控制組、b. 低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg)、c. 低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)、d. 低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg) 和 e. 高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)。

Fig. 4-6 The tumor X-ray image of C57BL/6 mice in different phase. IR: irradiation. B16-bearing control (a), 25 mg/kg lovastatin/day (b), 50 mg/kg lovastatin/day (c), 100 mg/kg RMDE/day (d) and 200 mg/kg RMDE/day (e).

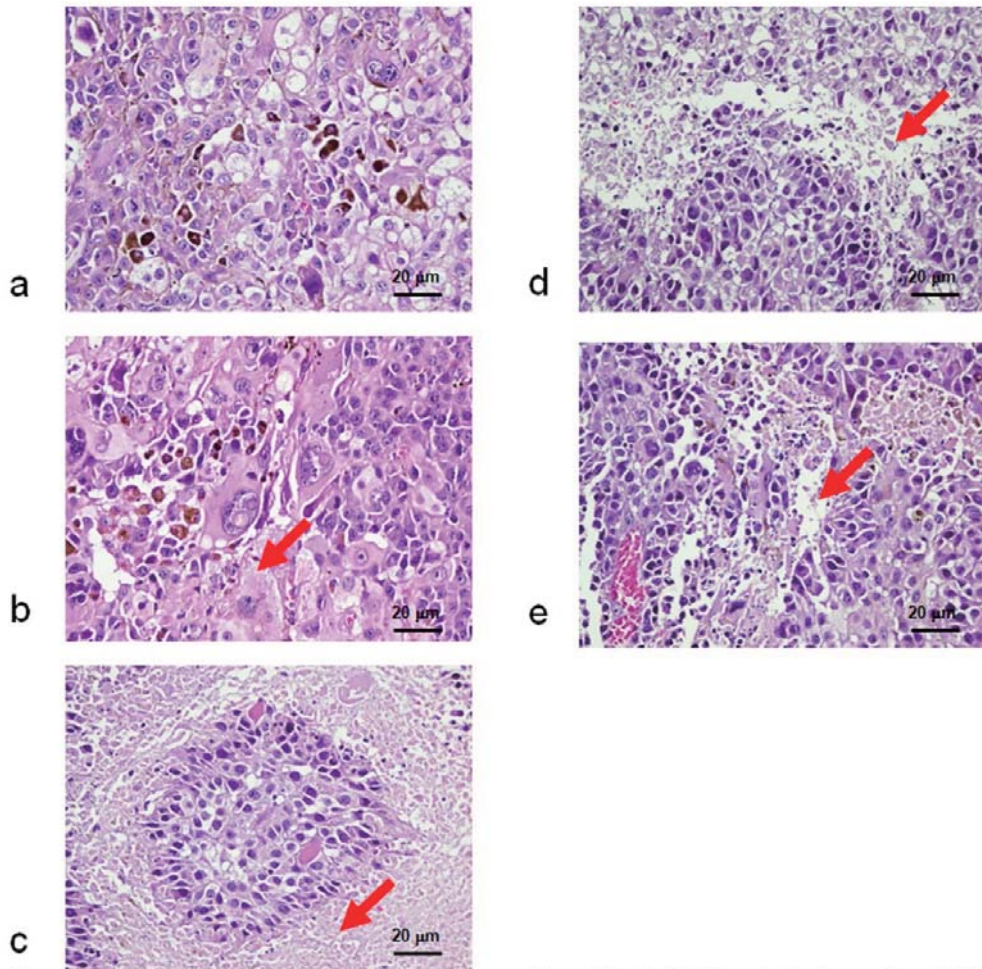


圖 4-7 實驗動物之腫瘤組織病理切片 (400 倍放大)

a. B16-荷瘤控制組、b. 低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg)、c. 低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)、d. 低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg) 和 e. 高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)。

Fig. 4-7 Histopathological findings of tumor with H&E staining in C57BL/6 mice (400X magnification).

B16-bearing control (a), 25 mg/kg lovastatin/day (b), 50 mg/kg lovastatin/day (c), 100 mg/kg RMDE/day (d), 200 mg/kg RMDE/day (e).

#### (四) 紅麴山藥酒萃物對於放射線治療後小鼠組織器官之影響

放射線會使水分子裂解產生活性氧屬 (reactive oxygen species, ROS) 或活性氮屬 (reactive nitrogen species, RNS), 使得體內氧化壓力增加, 導致發炎。此外, Camphausen 於 2001 年提出, 非致死性劑量的放射線處理, 會使癌細胞侵襲能力明顯增加, 並在動物模式中觀察到放射治療導致腫瘤轉移的現象 (Camphausen et al., 2001)。為評估紅麴山藥酒萃物是否具抑制因放射線所引起組織發炎與腫瘤轉移之現象, 乃於實驗結束後, 採取臟器進行外觀與病理切片分析。

由組織病理綜合評估表 (表 4-1) 與組織外觀影像圖可以看出, 接受放射線治療後, 不管餵食樣品與否, 對於小鼠之肺 (圖 4-8A)、腎 (圖 4-8B) 和肝臟 (圖 4-9A) 並不具影響, 顯示, 臟器並沒有因腫瘤細胞受放射線的誘發而產生腫瘤轉移的現象。以 H&E 染色所得結果亦可看出, 肺部 (圖 4-10)、腎臟 (圖 4-11) 和肝臟 (圖 4-12) 的組織切片圖, 各實驗組間並無顯著性差異。由此可知, 放射線並不直接或間接對於肺臟、腎臟和肝臟造成傷害, 腫瘤細胞亦未因放射線照射而發生腫瘤轉移的情形。此外, 如果所用樣品之劑量本身就會對動物體造成毒性傷害, 就算具有很好的輔助效果, 亦不能算是良好之保健食品, 由圖 4-11 和 4-12 結果可以看出, 本實驗所使用之 lovastatin 和 RMDE 劑量, 對於動物本身是安全的, 並不對小鼠之肝和腎等代謝器官造成傷害。

在脾臟方面, 因腫瘤與放射線治療的影響, 使身體產生嚴重的免疫反應, 而導致脾臟有腫大的情況產生 (表 4-1), 各組脾臟腫大所佔隻數比 (脾臟腫大隻數/總隻數) 分別為正常控制組 0/5、B16-荷瘤控制組 5/5、低劑量 lovastatin 組 3/5、高劑量 lovastatin 組 1/5、低劑量 RMDE 組 1/5 和高劑量 RMDE 組 0/5, 各組脾臟平均腫大程度 (圖 4-13) 為正常控制組 0、B16-荷瘤控制組為 3.6、低劑量 lovastatin 組 2.4、高劑量 lovastatin 組 0.4、低劑量 RMDE 組 0.4 和高劑量 RMDE 組 0, 當中高劑量 lovastatin 組、低劑量和高劑量 RMDE 組與 B16-荷瘤控制組具有顯著性差異 ( $p < 0.05$ )。而在脾臟 H&E 染色 (圖 4-14)

表 4-1 C57BL/6 小鼠於放射線治療後不同處理組織病理綜合評估

Table 4-1 Summary of pathological incidence of C57BL/6 mice with different treatment after radiotherapy.

Group	Thigh muscle (Tumor mass)	Lung (Metastasis)	Spleen (Splénomegaly)	Kidney	Liver
a	N	-	-	-	-
b	5/5	-	5/5	-	-
c	5/5	-	3/5	-	-
d	5/5	-	1/5	-	-
e	5/5	-	1/5	-	-
f	5/5	-	-	-	-

-: No effect; N: no tissue. a: normal control, b: B16-bearing control, c: 25 mg/kg lovastatin/day, d: 50 mg/kg lovastatin/day, e: 100 mg/kg RMDE/day, f: 200 mg/kg RMDE/day.

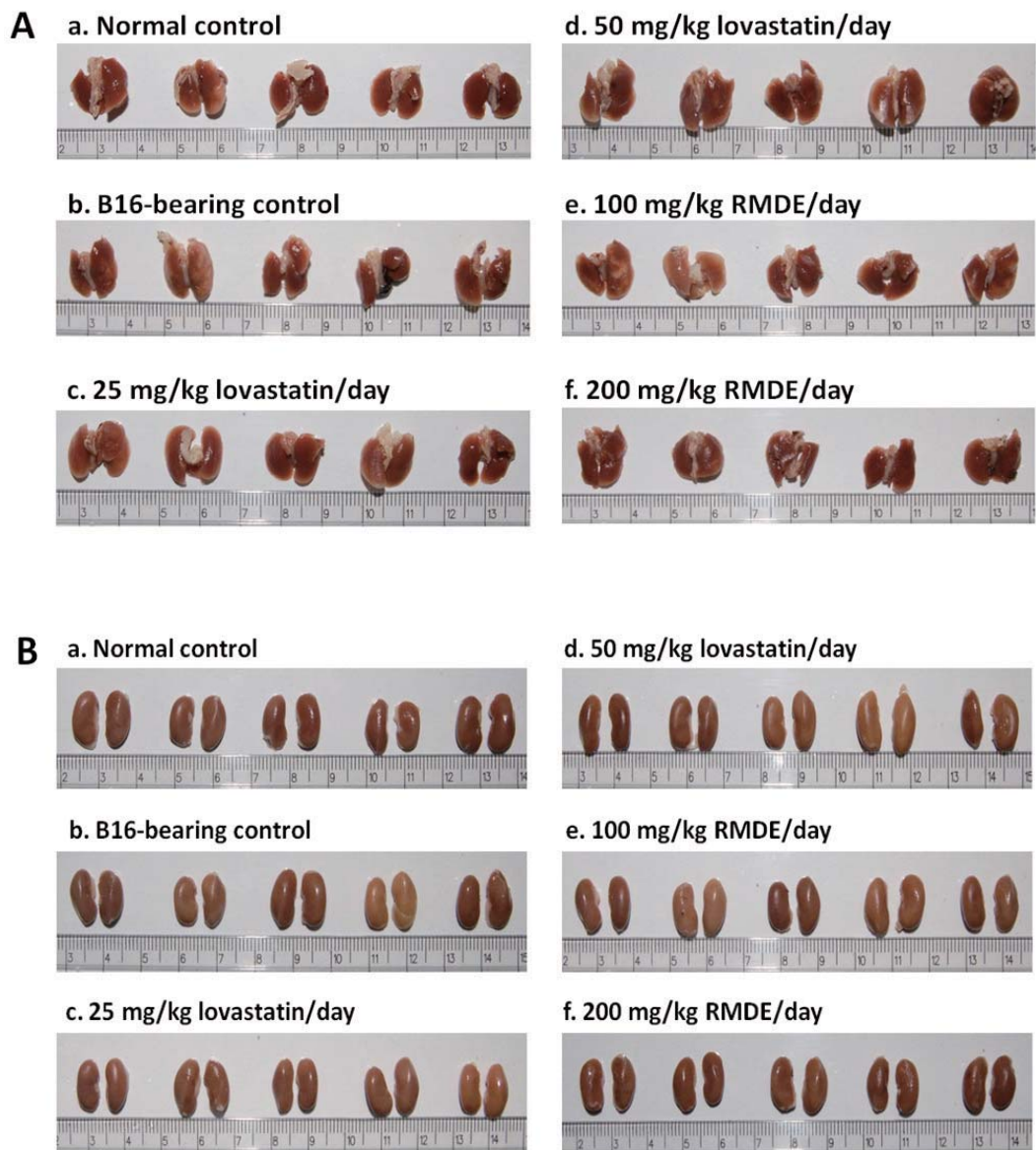


圖 4-8 臟器外觀圖。A：肺臟、B：腎臟

Fig. 4-8 Gross findings of lung and kidney in appearance. Lung (A); Kidney (B).

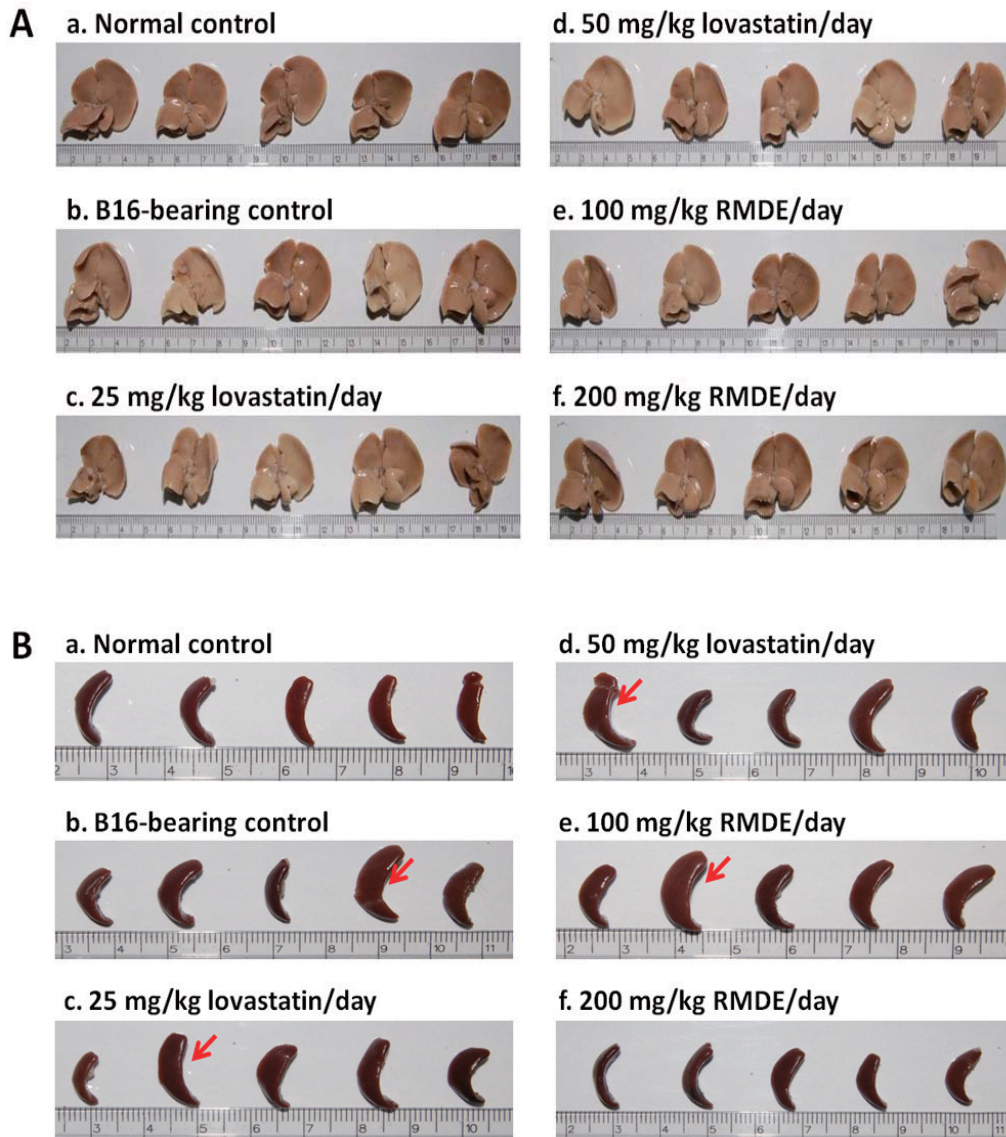


圖 4-9 臟器外觀圖。A：肝臟、B：脾臟

Fig. 4-9 Gross findings of liver and spleen in appearance. Liver (A); Spleen (B).



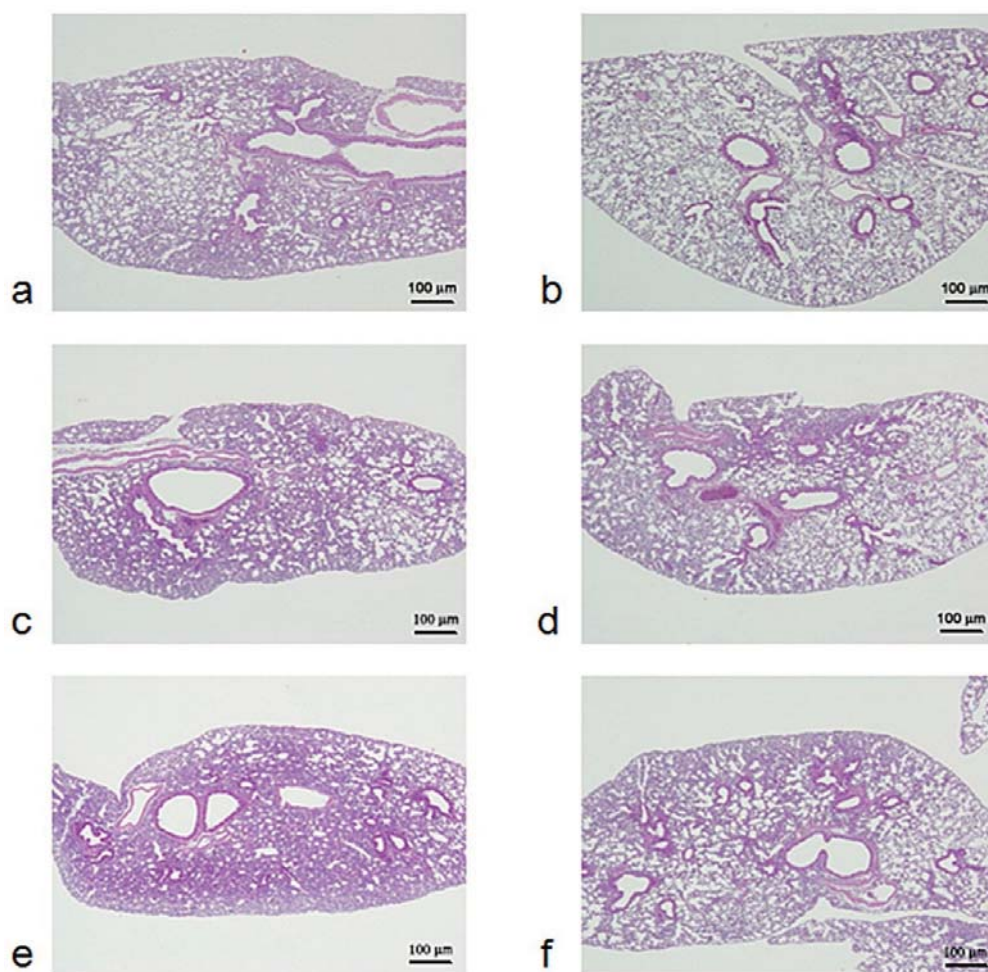


圖 4-10 肺臟組織切片 (40 倍放大)

a. 正常控制組、b. B16-荷瘤控制組、c. 低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg)、d. 低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)、e. 低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg) 和 f. 高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)。

Fig. 4-10 Histopathological findings of lung with H&E staining in C57BL/6 mice (40X magnification).

Normal control (a), B16-bearing control (b), 25 mg/kg lovastatin/day (c), 50 mg/kg lovastatin/day (d), 100 mg/kg RMDE/day (e), 200 mg/kg RMDE/day (f).

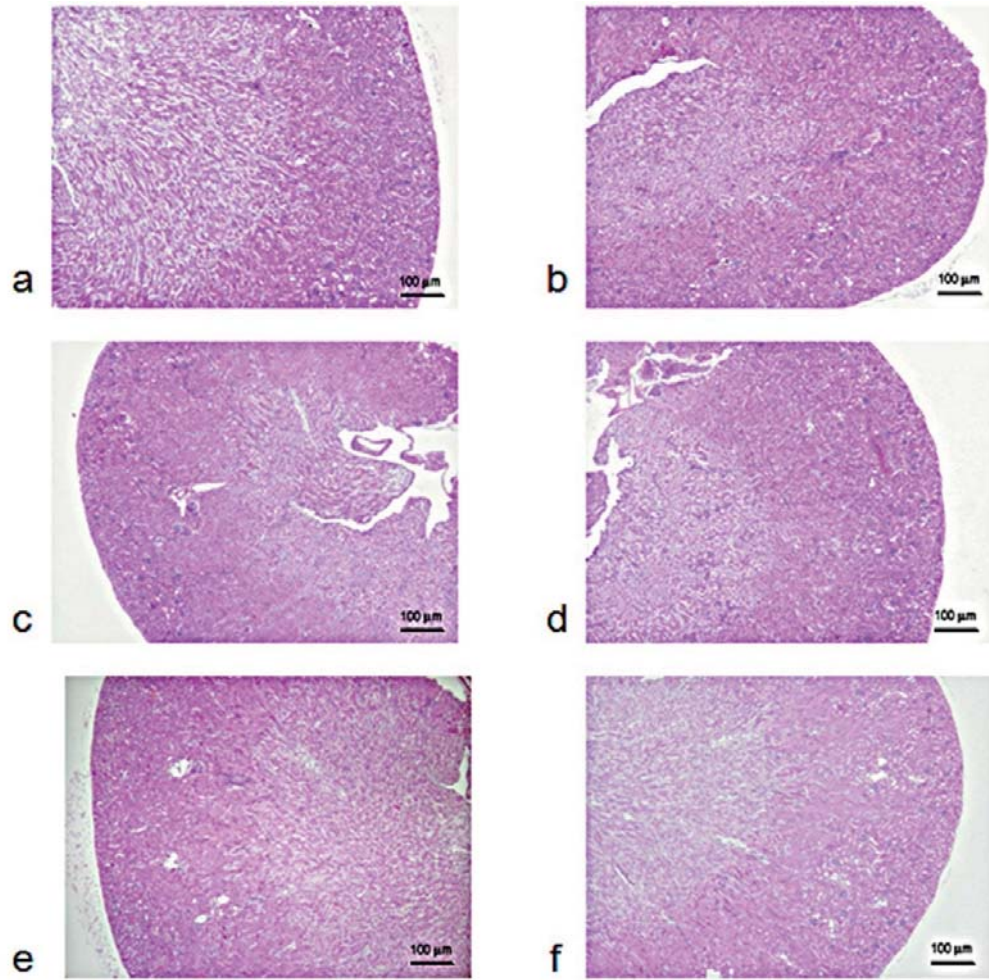


圖 4-11 腎臟組織切片 (40 倍放大)

a. 正常控制組、b. B16-荷瘤控制組、c. 低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg)、d. 低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)、e. 低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg) 和 f. 高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)。

Fig. 4-11 Histopathological findings of kidney with H&E staining in C57BL/6 mice (40X magnification).

Normal control (a), B16-bearing control (b), 25 mg/kg lovastatin/day (c), 50 mg/kg lovastatin/day (d), 100 mg/kg RMDE/day (e), 200 mg/kg RMDE/day (f).

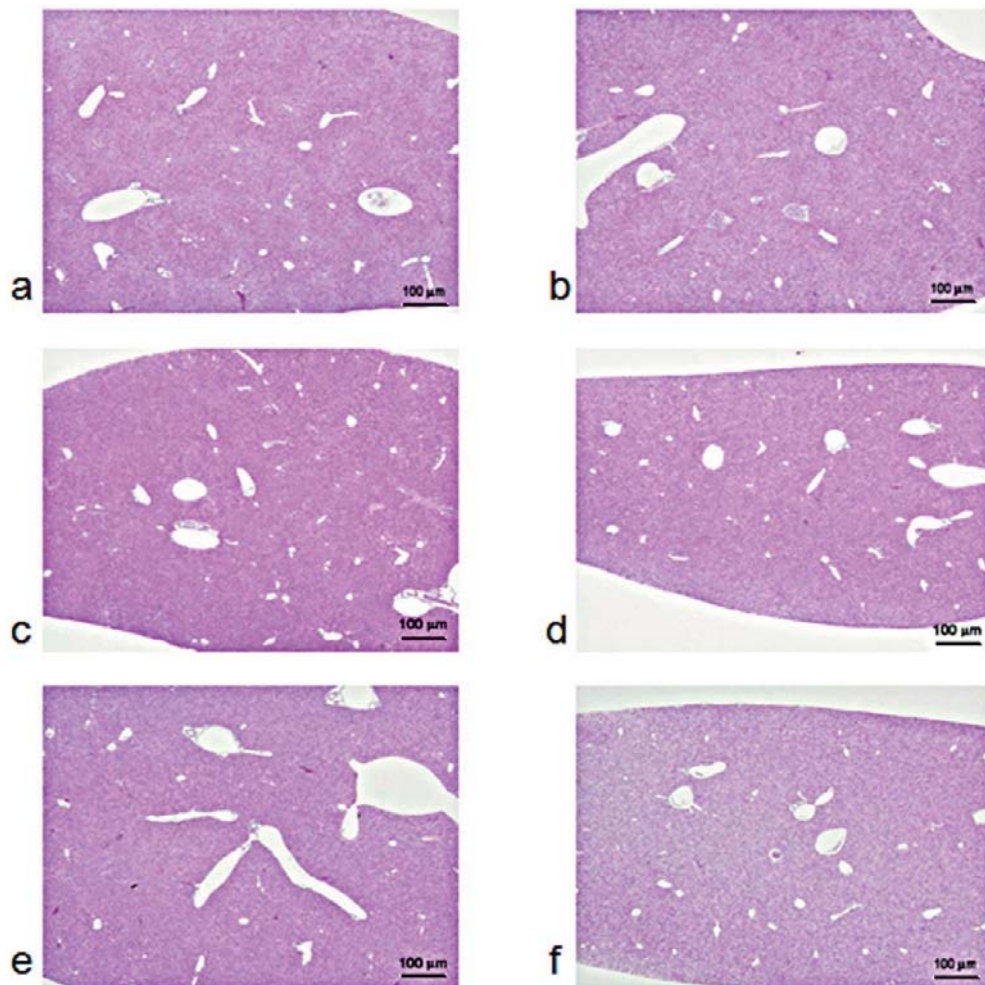
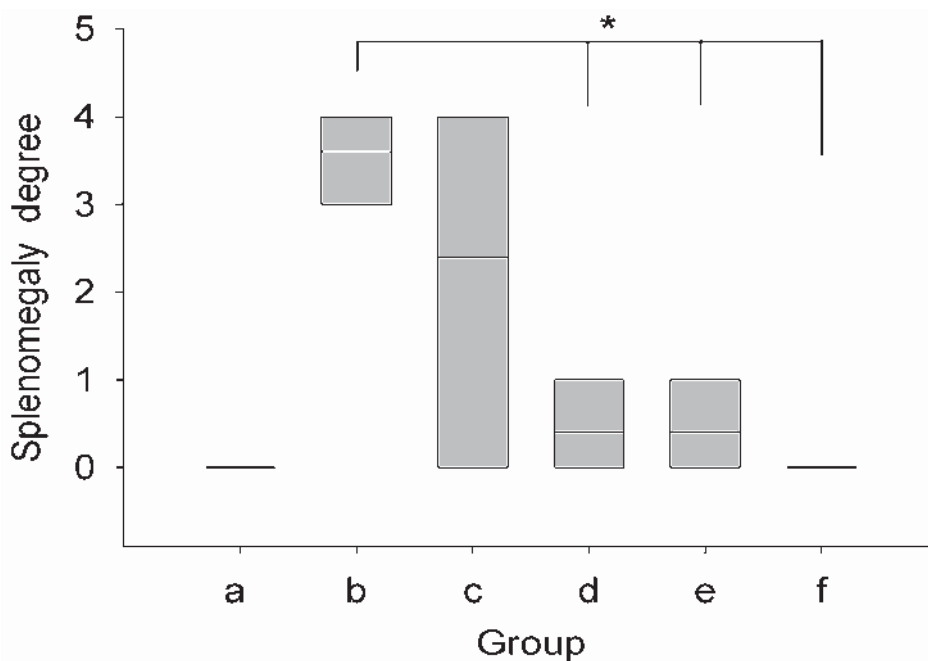


圖 4-12 肝臟組織切片 (40 倍放大)

a. 正常控制組、b. B16-荷瘤控制組、c. 低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg)、d. 低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)、e. 低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg) 和 f. 高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)。

Fig. 4-12 Histopathological findings of liver with H&E staining in C57BL/6 mice (40X magnification).

Normal control (a), B16-bearing control (b), 25 mg/kg lovastatin/day (c), 50 mg/kg lovastatin/day (d), 100 mg/kg RMDE/day (e), 200 mg/kg RMDE/day (f).



Group	a					b					c					d					e					f									
No.	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Degree	-	-	-	-	-	4	4	2	4	4	-	4	4	4	-	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ratio	0/5					5/5					3/5					1/5					1/5					0/5									

圖 4-13 C57BL/6 小鼠脾臟腫大病理程度

a. 正常控制組、b. B16-荷瘤控制組、c. 低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg)、d. 低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)、e. 低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg) 和 f. 高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)。

Fig. 4-13 The pathological incidence of splenomegaly in C57BL/6 mice.

Normal control (a); B16-bearing control (b); 25 mg/kg lovastatin/day (c); 50 mg/kg lovastatin/day (d); 100 mg/kg RMDE/day (e); 200 mg/kg RMDE/day (f).

Degree of lesions was graded from one to five depending on severity: 1 = minimal (< 1%); 2 = slight (1-25%); 3 = moderate (26-50%); 4 = moderate/severe (51-75%); 5 = severe/high (76-100%). Results are expressed as the mean  $\pm$  SD, \*,  $P < 0.05$ ,  $n=5$ .

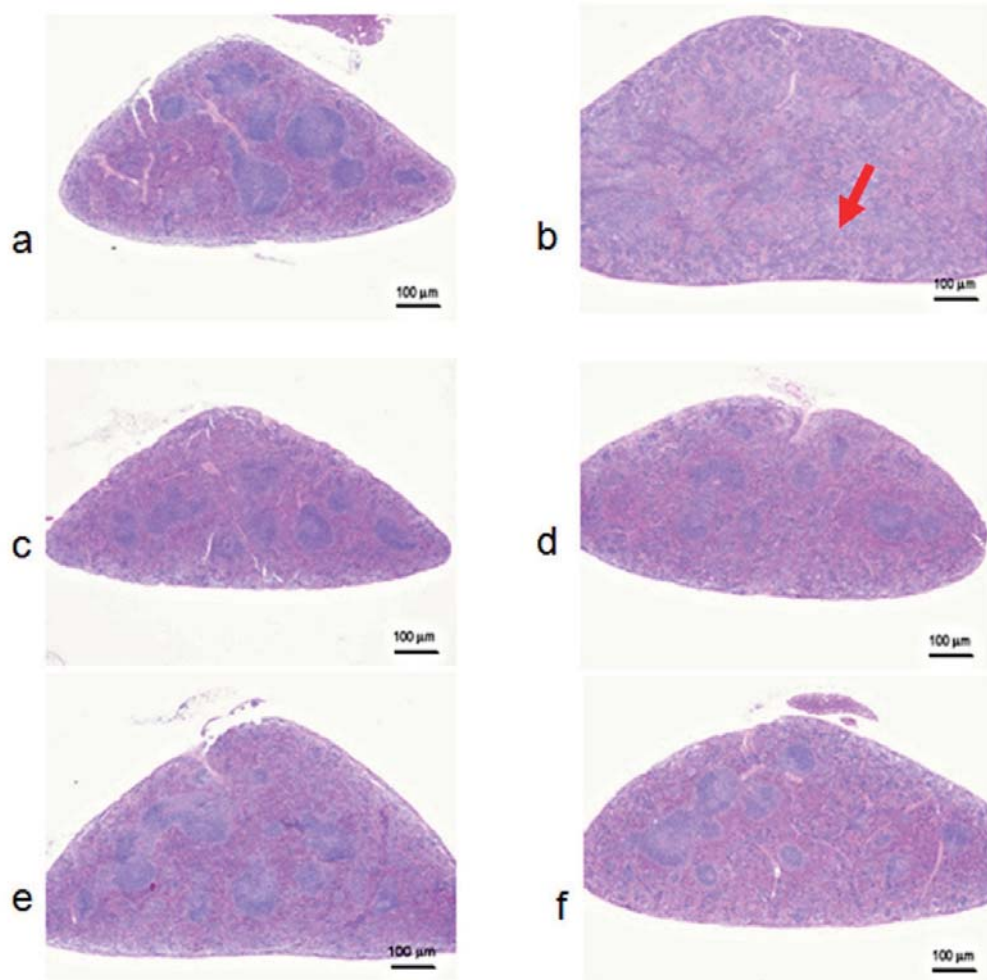


圖 4-14 脾臟組織切片 (40 倍放大)

a. 正常控制組、b. B16-荷瘤控制組、c. 低劑量 lovastatin 組 (25 mg/kg)、d. 低劑量 lovastatin 組 (50 mg/kg)、e. 低劑量 RMDE 組 (100 mg/kg) 和 f. 高劑量 RMDE 組 (200 mg/kg)。

Fig. 4-14 Histopathological findings of spleen with H&E staining in C57BL/6 mice (40X magnification).

Normal control (a); B16-bearing control (b); 25 mg/kg lovastatin/day (c); 50 mg/kg lovastatin/day (d); 100 mg/kg RMDE/day (e); 200 mg/kg RMDE/day (f).

上亦發現，B16-荷瘤控制組於組織切片上，有大量淋巴球增生的情況（紅色箭頭處），其餘五組與正常控制組相比，並無顯著性差異。由於淋巴球為免疫細胞之一，在體內感染和慢性發炎上，扮演重要角色，推測應為放射線照射後所產生的 ROS 和 RNS 攻擊細胞的 DNA、蛋白質和磷脂質等巨分子，對正常細胞造成損傷，導致體內產生持續性的發炎反應，而 RMDE 中具有多種抗氧化與抗發炎物質，包括：monascin (Lee et al., 2006b)、ankaflavin (Akihisa et al., 2005a) 和 dimerumic acid (Aniya et al., 2000; Taira et al., 2002; Tsai et al., 2009)，推測應為上述成分之間相互作用下，減輕了放射線對於正常組織之傷害，緩解體內的氧化傷害與免疫反應，而使得脾臟回復至正常小鼠之水平。

#### **(五) 紅麴山藥酒萃物對於放射線療程後小鼠血清之影響**

##### **1. 血清促發炎激素 (IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ ) 分析**

放射線治療之所以會對正常組織有所傷害，主要原因為產生發炎反應，由於腫瘤中並不全然由腫瘤細胞組成，還包含了纖維母細胞 (fibroblasts) 與巨噬細胞 (macrophage)，因此，當放射線對於腫瘤進行照射時，會誘使腫瘤細胞分泌化學激素 (chemokine) 或直接刺激巨噬細胞大量分泌促發炎激素 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和 interleukin-6 (IL-6) 使得身體產生發炎反應。文獻指出，發炎過程中的過氧化物與自由基會導致基因突變 (Jackson and Loeb, 2001) 且癌細胞長期處於慢性發炎情況下，會轉為能利用發炎因子的形式 (Lazar-Molnar et al., 2000)。由此可知，如何避免放射線所引起的發炎反應，為一急需解決的課題。

有鑑於脾臟病理切片檢查報告 (表 4-1) 所發現脾臟腫大的情形，為了更進一步探討紅麴山藥酒萃物是否能緩解因放射線治療所衍生的發炎反應，乃針對小鼠血清促發炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 進行分析。由圖 4-15 結果顯示，B16-荷瘤控制組與正常控制組在血清 TNF- $\alpha$  蛋白質表現上，並無明顯差異，但高劑

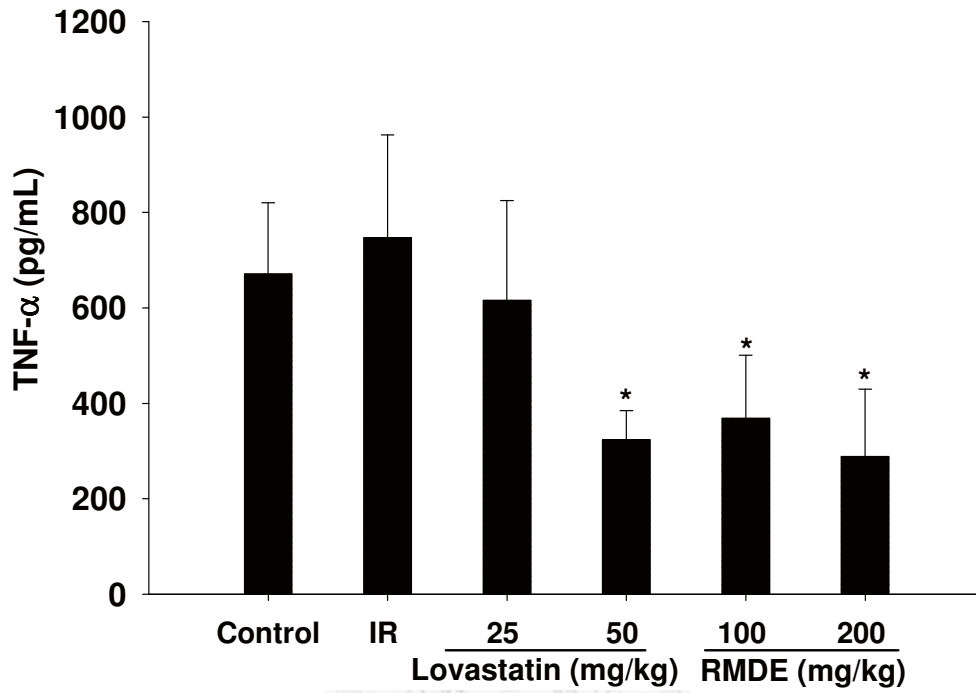


圖 4-15 放射線治療後 C57BL/6 小鼠血清 TNF- $\alpha$  表現

Fig. 4-15 Serum TNF- $\alpha$  levels in C57BL/6 mice after radiotherapy.

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD, \* $p$ <0.01 vs. IR, n=5.

量的 lovastatin 組、低劑量的 RMDE 組和高劑量的 RMDE 組與 B16-荷瘤控制組相比，分別下降了 57%、51% 和 61%，具顯著性差異 ( $p < 0.01$ )。在 IL-1 $\beta$  部分，B16-荷瘤控制組與正常控制組相比，其蛋白質表現上升了 42%，達到顯著性差異 ( $p < 0.01$ )，顯示 IL-1 $\beta$  會在放射線治療的過程中提高，而餵食 lovastatin 與 RMDE 組，各組下降程度分別為低劑量 lovastatin 組 45%、高劑量 lovastatin 組 45%、低劑量 RMDE 組 59% 和高劑量 RMDE 組 51%，與 B16-荷瘤控制組比皆具顯著性差異 ( $p < 0.01$ ) (圖 4-16)。在 IL-6 部分，B16-荷瘤控制組與正常控制組相比，蛋白質表現量提高了 48%，具顯著性差異 ( $p < 0.01$ )，餵食低劑量 lovastatin 組與 B16-荷瘤控制組在 IL-6 蛋白質表現上與 B16-荷瘤控制組相當，並未因餵食 lovastatin 而對 IL-6 蛋白質表現量有所影響，但在高劑量 lovastatin 組、低劑量 RMDE 組和高劑量 RMDE 組，IL-6 蛋白質表現量分別下降 46%、70% 和 49%，達統計上之顯著性差異 ( $p < 0.01$ ) (圖 4-17)。值得注意的是在高劑量的 RMDE 餵食下，血清中 IL-6 蛋白質表現量比低劑量的 RMDE 組還要來的高，可能是高劑量的 RMDE 處理，對動物體內造成氧化傷害，導致體內產生輕微的慢性發炎反應，因而造成此現象。

由以上結果可以看出，放射線能誘發血清促發炎激素 IL-1 $\beta$  和 IL-6 蛋白質大量表現，對於 TNF- $\alpha$  蛋白質表現並不具影響。由於 TNF- $\alpha$  為早期立即性發炎指標，因而導致實驗末期無法明顯看出正常控制組與 B16-荷瘤控制組在 TNF- $\alpha$  表現上之差異。但整體來說，RMDE 的餵食對於血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 蛋白質表現確實都具有顯著性降低之效果。Martinkova 於 1999 年曾提出 ankaflavin 和 monascin 對老鼠脾臟 T 細胞具有免疫抑制的作用 (Martinkova et al., 1999)。而本實驗所使用之紅麴山藥酒萃物中含大量的 ankaflavin 和 monascin，推測係此兩種化合物對於小鼠體內因放射線治療而導致 T 細胞大量增生之情況產生免疫抑制，減少放射線治療所引起 IL-1 $\beta$  和 IL-6 蛋白質的大量表現，降低血清中 TNF- $\alpha$  的含量，而達到抑制體內發炎反應的效果。



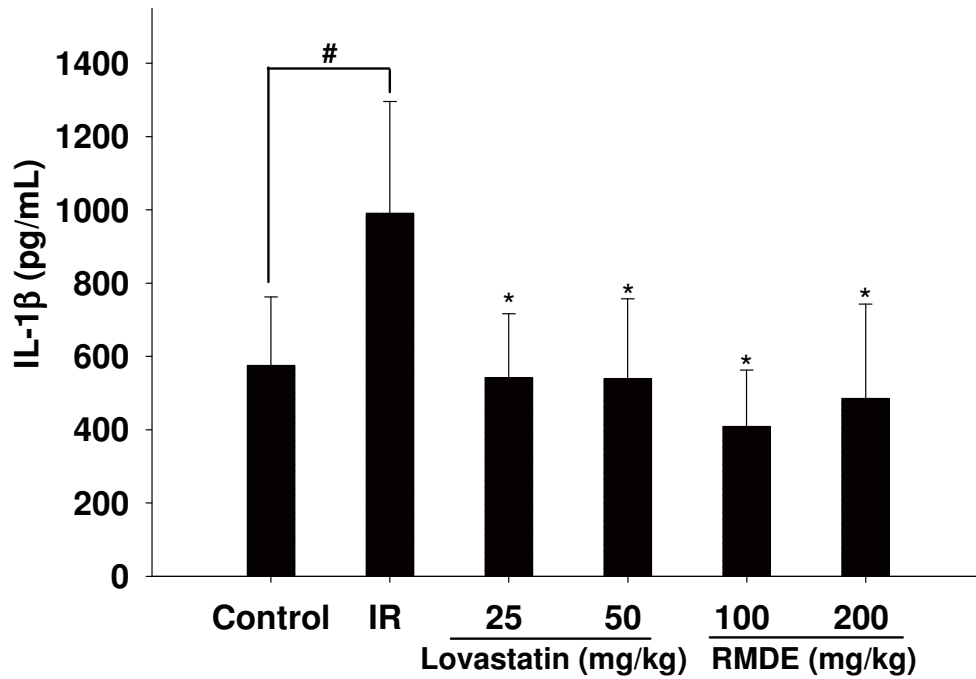


圖 4-16 放射線治療後 C57BL/6 小鼠血清 IL-1 $\beta$  表現

Fig. 4-16 Serum IL-1 $\beta$  levels in C57BL/6 mice after radiotherapy.

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD, # $p$ <0.01 vs. control, \* $p$ <0.01 vs. IR, n=5.

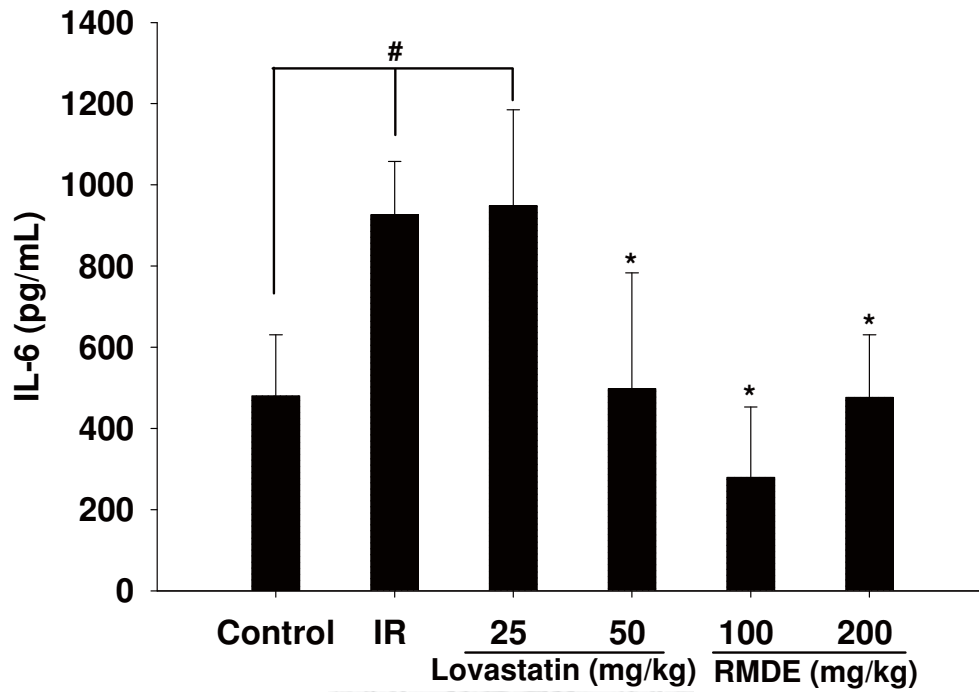


圖 4-17 放射線治療後 C57BL/6 小鼠血清 IL-6 表現

Fig. 4-17 Serum IL-6 levels in C57BL/6 mice after radiotherapy.

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD, # $p$ <0.01 vs. control, \* $p$ <0.01 vs. IR, n=5.

## 2. 轉換生長因子- $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) 分析

放射線除了會傷害正常組織產生發炎反應外，亦會直接或間接活化 TGF- $\beta 1$ ，使其與 TGF- $\beta$  受體結合，啟動 smad 訊息傳遞路徑，最後導致纖維母細胞不正常增生與膠原蛋白的沉積，而使組織產生纖維化的現象 (Bentzen, 2006)。此外，放射線所引起的 IL-1 $\beta$  和 IL-6 大量表現亦會促使組織纖維化 (Chen et al., 2001; Chen et al., 2005)。為了評估紅麴山藥酒萃物是否能緩解放射線所引起組織纖維化的情形，取小鼠血清進行 TGF- $\beta 1$  分析。

由圖 4-18 得知，接受放射線治療而未餵飼任何樣品的 B16-荷瘤控制組，其 TGF- $\beta 1$  蛋白質表現量與正常控制組相比增加了 29%，具顯著性差異 ( $p < 0.05$ )，顯示本實驗所建立之放射線治療模式會提升小鼠體內 TGF- $\beta 1$  蛋白質表現量，餵食低劑量與高劑量 lovastatin 和餵食低劑量與高劑量 RMDE 組在 TGF- $\beta 1$  蛋白質表現量上，則分別下降了 23%、27%、33% 和 26%，當中高劑量 lovastatin 和餵食低劑量與高劑量 RMDE 組與 B16-荷瘤控制組相比具顯著性差異 ( $p < 0.05$ )，但餵食低劑量的 lovastatin 組並無顯著效果，可能是劑量太低而無法有效抑制 TGF- $\beta 1$  蛋白質的表現，由上述結果顯示，RMDE 的餵食可以有效抑制因放射線治療引起 TGF- $\beta 1$  上升，而紅麴山藥酒萃物中富含 monascin、ankaflavin 和 citrinin，是哪一種成分能緩解因放射線治療而導致 TGF- $\beta 1$  上升的情況目前尚不明確，有待後續細胞試驗確認。

## 3. 血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 分析

血管內皮生長因子 (VEGF) 為腫瘤生長與轉移之重要指標，腫瘤經放射線照射後，會大量分泌 VEGF 以刺激新血管生成，供給更多的養分，以便生長與茁壯。過去研究也顯示，高能量的放射治療容易引起腫瘤轉移，而針對此生物效應設計實驗探討放射線所活化腫瘤細胞之移動侵襲力等相關基因研究亦指出，運用非致死性劑量處理腫瘤細胞後，放射線能激發細胞轉移相關訊息的活化 (Bea

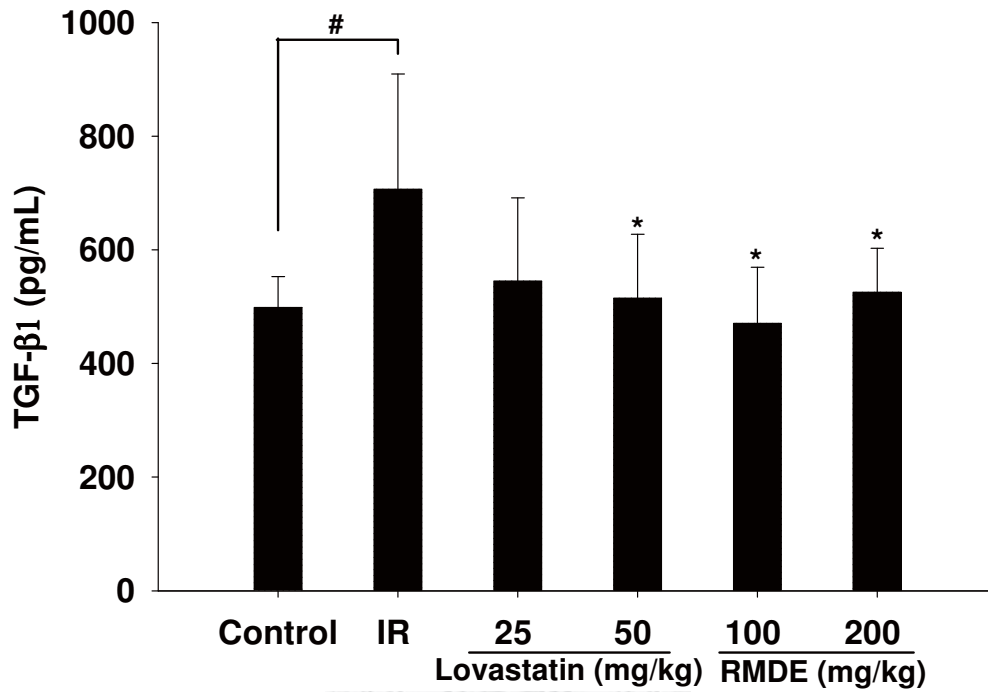


圖 4-18 放射線治療後 C57BL/6 小鼠血清 TGF-β1 表現

Fig. 4-18 Serum TGF-β1 levels in C57BL/6 mice after radiotherapy. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD, #  $p < 0.05$  vs. control, \*  $p < 0.05$  vs. IR, n=5.

et al., 2003; Dent et al., 2003; Artman et al., 2010)。為了瞭解紅麴山藥酒萃物是否具抑制因放射線療法所引起之 VEGF 的上升，導致治療的惡化，因此進行此實驗。

由圖 4-19 可以看出，只接受放射線治療未給予樣品的 B16-荷瘤控制組，其 VEGF 蛋白質表現量比正常控制組上升 54%，達顯著性差異 ( $p<0.01$ )，顯示腫瘤細胞確實會因放射線刺激而誘發 VEGF 蛋白質表現，導致血管新生，而餵食低劑量與高劑量 lovastatin 組和餵食低劑量與高劑量 RMDE 組，VEGF 的表現量分別下降了 66%、70%、80% 和 79%，各實驗組與 B16-荷瘤控制組相比，皆具顯著性差異 ( $p<0.01$ )。此結果與本研究室先前所發表之紅麴米酒萃物 (ethanol extract of red mold rice, RMRE) 抑制肺癌轉移之結果相符 (Ho and Pan, 2009)。餵食 RMDE，確實能有效抑制因放射線照射而誘發腫瘤細胞大量表現 VEGF 之情形，減少腫瘤復發以及防止癌細胞轉移。

## 二、細胞實驗

### (一) 比較紅麴山藥酒萃物及其純物質對於黑色素細胞瘤 (B16-F0) 和皮膚初代細胞 (skin primary cell) 之影響

有鑑於動物實驗得知 RMDE 具有抑制放射線治療後腫瘤之復發與促進腫瘤細胞壞死等現象，為了更進一步探討 RMDE 中究竟為何種成分抑制腫瘤細胞的生長以及比較各成分對於正常細胞是否具有毒性傷害，乃進行此實驗。首先以 HPLC 進行 RMDE 成分分析，由實驗結果 (表 4-2) 顯示，RMDE 中之主要功效成分為：monascin、ankaflavin 和 citrinin，其含量分別為：9.77、3.12 和 0.06 mg/g。因此，後續細胞實驗將以此三種純物質進行探討。

將 B16-F0 和小鼠皮膚初代細胞以 0、15、30、45、60 和 75  $\mu\text{g/mL}$  六種不同濃度之 RMDE 處理，分別培養 24 與 48 小時，來觀察 RMDE 對於這兩株細胞的抑制情形。由圖 4-20A 得知，以 15  $\mu\text{g/mL}$  的 RMDE 處理 24 小時，

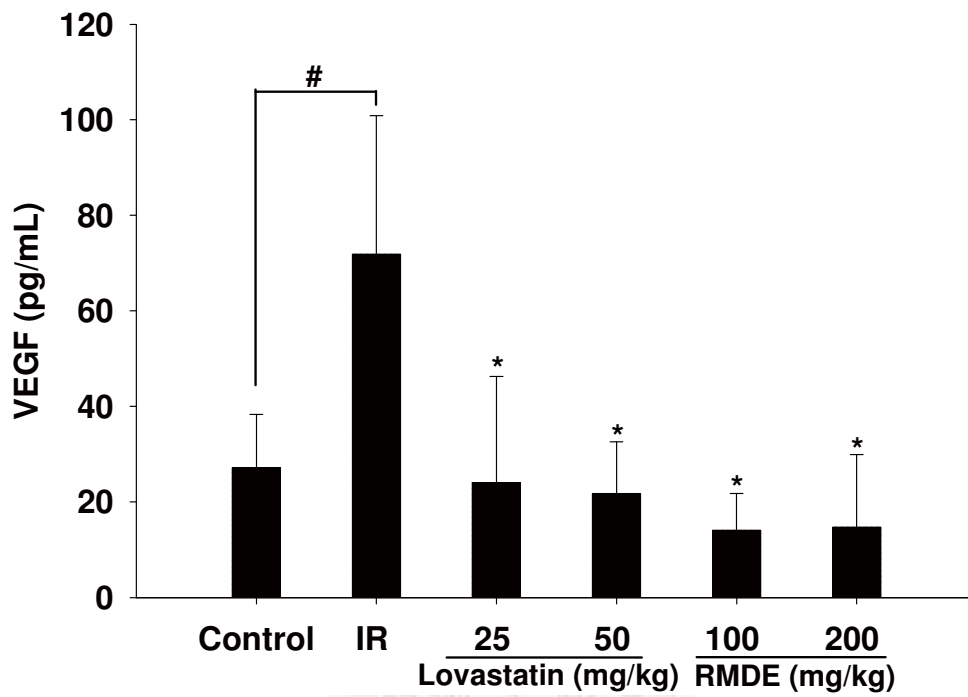


圖 4-19 放射線治療後 C57BL/6 小鼠血清 VEGF 表現

Fig. 4-19 Serum VEGF levels in C57BL/6 mice after radiotherapy.

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD, # $p$ <0.01 vs. control, \* $p$ <0.01 vs. IR, n=5.

表 4-2 紅麴山藥酒萃物中 monacolin K、ankaflavin、monascin 及 citrinin 含量

Table 4-2 The concentration of monacolin K, ankaflavin, monascin and citrinin in ethanol extracts of red mold dioscorea. N/D = not detected.

Compound	Concentration (mg/g RMDE)
Monacolin K	N/D
Ankaflavin	3.12
Monascin	9.77
Citrinin	0.06

對於 B16-F0 和小鼠皮膚初代細胞並不具明顯的抑制效果，其存活率分別為 92 和 89%，但隨著濃度的提升，兩株細胞的存活率也開始下降。濃度為 45  $\mu\text{g/mL}$  時，小鼠皮膚初代細胞的存活率為 68%，但 B16-F0 細胞卻只剩下 38%，當濃度達到 75  $\mu\text{g/mL}$  時，B16-F0 和小鼠皮膚初代細胞的存活率分別為 57% 和 10%，相差 47%。處理 48 小時 (圖 4-20B)，RMDE 對於 B16-F0 細胞的抑制效果比起 24 小時更為明顯，RMDE 濃度在 30  $\mu\text{g/mL}$  時，B16-F0 和小鼠皮膚初代細胞的存活率分別為 31% 和 93%，於 45  $\mu\text{g/mL}$  時，B16-F0 細胞的存活率更只剩下 5%，而小鼠皮膚初代細胞卻還有 69%，當濃度提升到 75  $\mu\text{g/mL}$  時，B16-F0 和皮膚初代細胞的存活率分別為 50% 和 4%，兩者相差 46%。顯示，以不同濃度的 RMDE 處理 B16-F0 和小鼠皮膚初代細胞 24 與 48 小時，RMDE 對於 B16-F0 有較強的細胞毒性，且呈現劑量效應 (dose-dependent) 與時間效應 (time-dependent)。

以 ankaflavin、monascin 和 citrinin 處理小鼠皮膚初代細胞 (圖 4-21A) 和 B16-F0 細胞 24 小時 (圖 4-21B)，實驗結果顯示，三種純物質在不同濃度的處理下，對於小鼠皮膚初代細胞並不具明顯的抑制效果，當濃度達 8  $\mu\text{g/mL}$  時，小鼠皮膚初代細胞的存活率分別為 ankaflavin 的 87%、monascin 的 87% 和 citrinin 的 81%。由 B16-F0 細胞毒性試驗結果得知，以不同濃度之 ankaflavin 和 citrinin 處理，所得結果與小鼠皮膚初代細胞實驗結果相當。但當 monascin 濃度達 6  $\mu\text{g/mL}$  時，B16-F0 細胞的存活率剩下 77%，如果將濃度提高至 8  $\mu\text{g/mL}$ ，存活率更只剩下 66%。由此可知，RMDE 中的 ankaflavin 和 citrinin 對於皮膚初代細胞和 B16-F0 並不具明顯抑制效果，而 monascin 對於正常細胞 (skin primary cell) 不具明顯抑制，但卻可以有效抑制癌細胞 (B16-F0) 的生長。

## (二) 放射線誘導 Raw 264.7 細胞發炎模式之建立

為了瞭解紅麴山藥酒萃物中何種成分具有緩解因放射線所誘發的發炎反



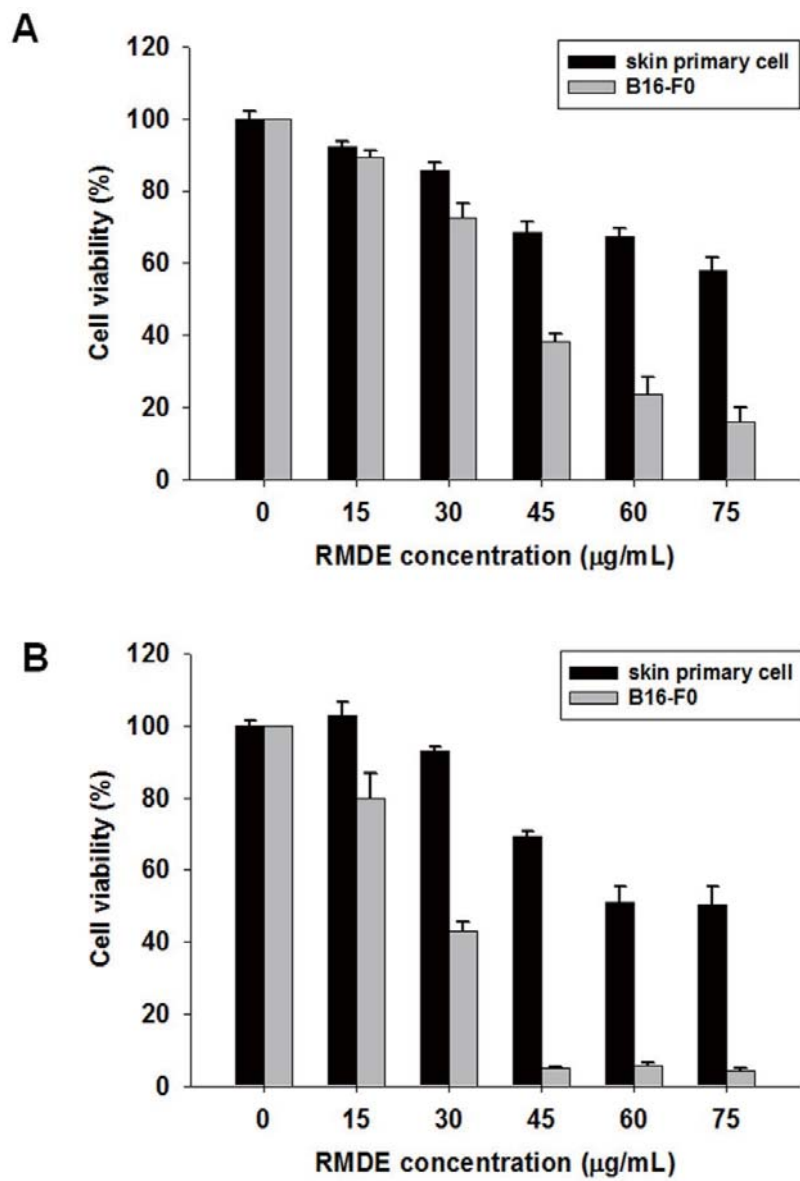


圖 4-20 RMDE 抑制 B16-F0 和皮膚初代細胞生長之劑量與時間關係。 A：24 小時；B：48 小時。

Fig. 4-20 Concentration- and time-dependent effects of RMDE on cell viability of B16-F0 and skin primary cells. 24 hr (A); 48 hr (B).

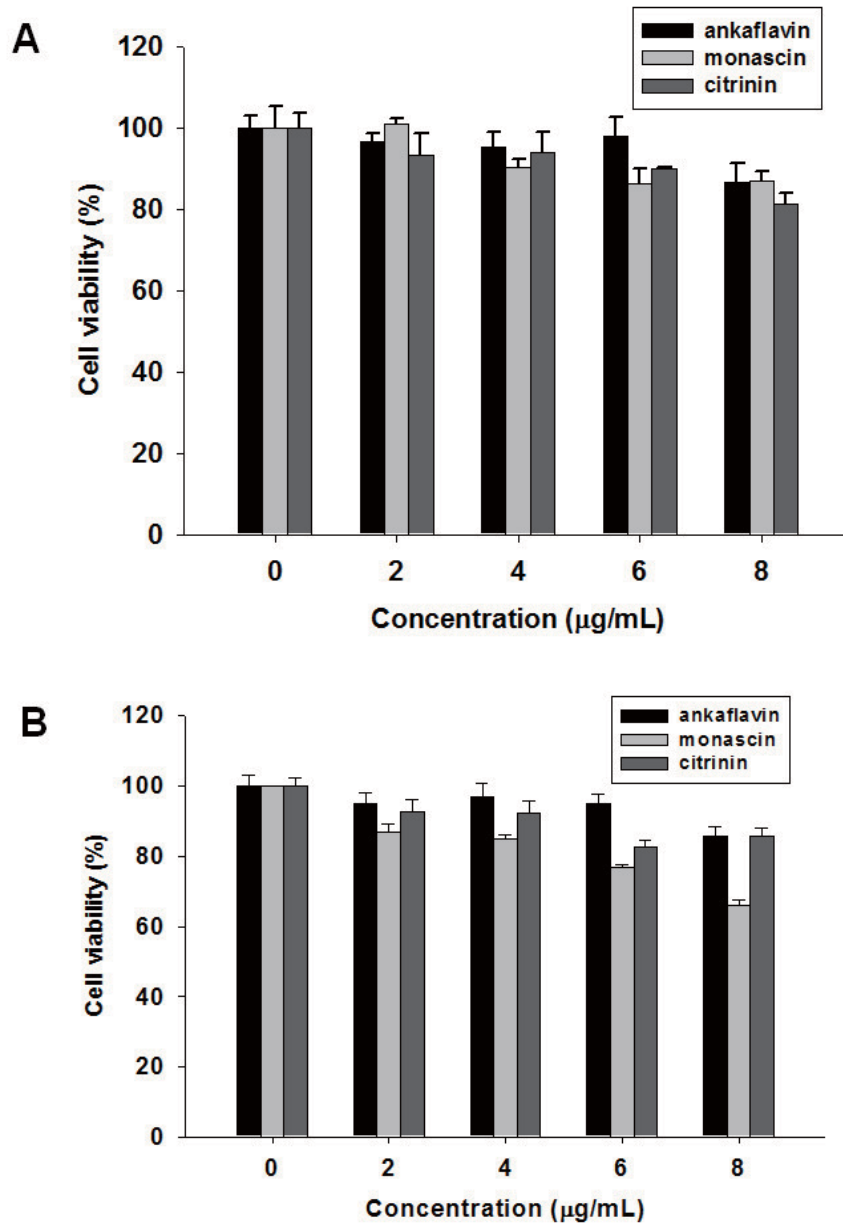


圖 4-21 Ankaflavin、monascin 和 citrinin 對於 B16-F0 和皮膚初代細胞生長之劑量關係。A：皮膚初代細胞；B：B16-F0。

Fig. 4-21 Concentration-dependent effects of ankaflavin, monascin and citrinin on cell viability of B16-F0 and skin primary cells.

Skin primary cells (A); B16-F0 (B).

應，因此以小鼠巨噬細胞株 Raw 264.7 為研究對象，利用反轉錄聚合酶鏈反應 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 技術，探討不同放射線劑量與培養時間對於細胞中之促發炎激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 在 mRNA 表現上之差異，以做為後續評估之模式。

由圖 4-22A 得知，TNF- $\alpha$  mRNA 在 1 和 2 Gy 的放射線照射下，具有最佳的表現量，在 IL-1 $\beta$  方面 (圖 4-22B)，以 0.5、1、2 和 4 Gy 的放射線照射，皆可有效誘發細胞中 IL-1 $\beta$  mRNA 的表現，而 IL-6 部分 (圖 4-22C) 則隨著放射線劑量的提高，細胞中 IL-6 mRNA 的表現量也跟著提升，以 2 Gy 達最高值。

接著以 2 Gy 的放射線照射細胞後，培養不同時間，觀察細胞中各個促發炎激素 mRNA 的表現，由圖 4-23A 得知，細胞在照完放射線後培養 0.5 和 1 小時，具有最佳的 TNF- $\alpha$  mRNA 表現量，照完放射線後培養 0.5、1、2 和 4 小時，皆可有效誘發 IL-1 $\beta$  mRNA 的表現，且各組間無明顯差異 (圖 4-23B)，IL-6 mRNA 表現量則隨著時間的增加而提高，呈現時間效應 (time-dependent) (圖 4-23C)。綜合以上結果，放射線誘導細胞發炎模式 2 Gy 之放射線對於 Raw 264.7 細胞進行照射後，分別培養 1 (TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ ) 和 4 (IL-6) 小時，來觀察促發炎激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表現上之差異。

### (三) 紅麴山藥酒萃物及其純物質對於放射線誘發 Raw 264.7 細胞發炎之影響

放射線治療最大的副作用莫過於發炎反應的產生，由動物實驗結果得知，餵食 RMDE 能有效降低小鼠血清促發炎因激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的產生，為了更進一步探討 RMDE 成分中造成此現象之成分，乃進行此實驗。依據本研究建立之放射線誘導 Raw 264.7 細胞發炎模式進行評估，RMDE 濃度選用 0、15、30、60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，ankaflavin、monascin 和 citrinin 則選用 0、2、4 和 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  進行實驗。

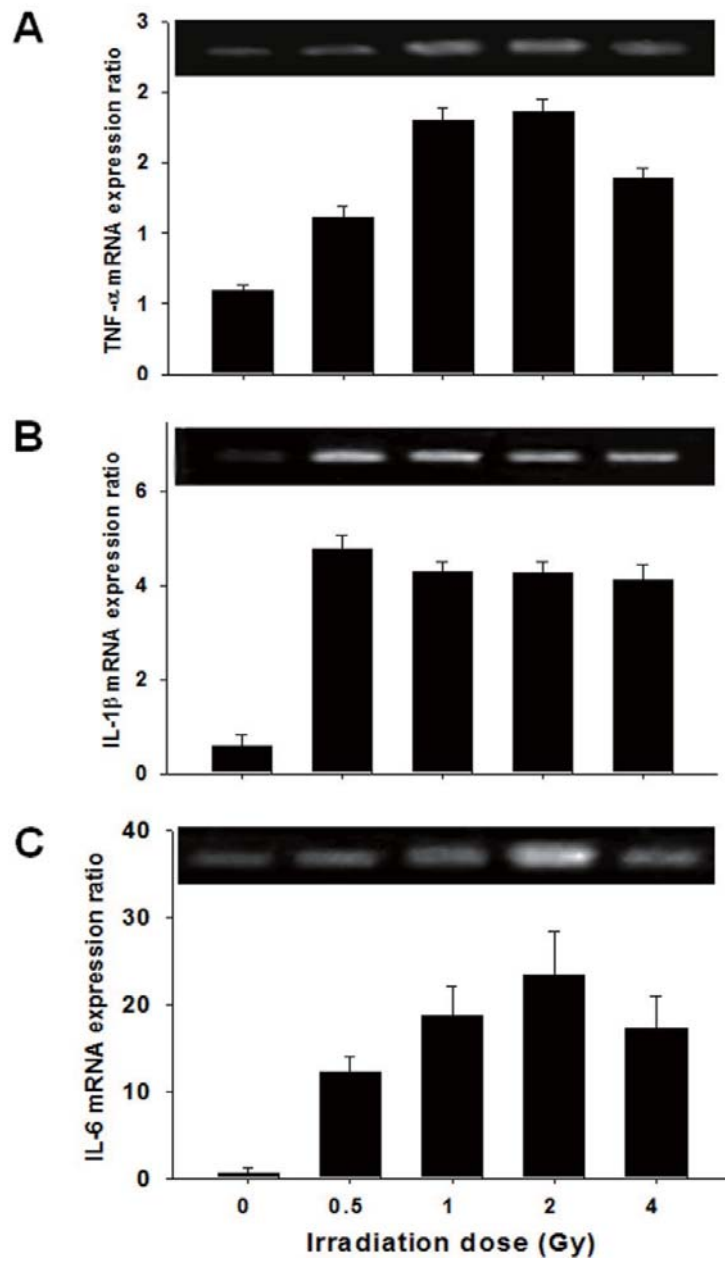


圖 4-22 不同放射線劑量照射 Raw 264.7 細胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表現之影響。A : TNF- $\alpha$  ; B : IL-1 $\beta$  ; C : IL-6。

Fig. 4-22 The dose effect of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expression in Raw 264.7 cells after irradiation. TNF- $\alpha$  (A); IL-1 $\beta$  (B); IL-6 (C).

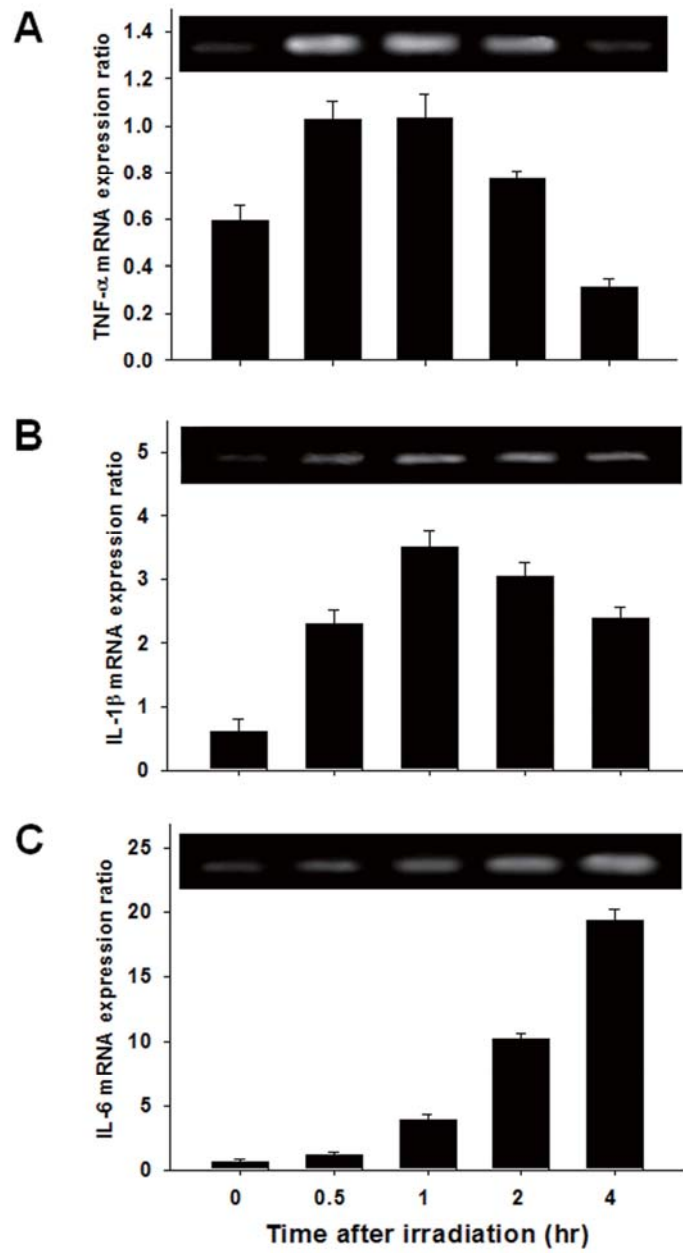


圖 4-23 以放射線照射不同時間 Raw 264.7 細胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表現之影響。A : TNF- $\alpha$  ; B : IL-1 $\beta$  ; C : IL-6。

Fig. 4-23 The time effect of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expression in Raw 264.7 cells after irradiation. TNF- $\alpha$  (A); IL-1 $\beta$  (B); IL-6 (C).

由圖 4-24A 結果得知，30  $\mu\text{g/mL}$  之 RMDE 可顯著降低 TNF- $\alpha$  mRNA 的表現 ( $p < 0.01$ )，而當濃度提升至 60  $\mu\text{g/mL}$  時，其效果更佳，效果與控制組相當。由圖 4-24B 得知，2  $\mu\text{g/mL}$  ankaflavin 與 IR 組有顯著性差異 ( $p < 0.01$ )，且隨著劑量的提升 TNF- $\alpha$  mRNA 的表現也隨著下降，呈現劑量效應 (dose-dependent)。Monascin (圖 4-24C) 和 citrinin (圖 4-24D) 之結果相同，2、4 或 8  $\mu\text{g/mL}$  皆無顯著效果。

由圖 4-25A 結果得知，以 15、30 或 60  $\mu\text{g/mL}$  的 RMDE 處理細胞，皆可有效抑制細胞中 IL-1 $\beta$  mRNA 的表現，呈現劑量效應 (dose-dependent)，且達顯著性差異 ( $p < 0.01$ )。由圖 4-25B 及圖 4-25C 之結果得知，不論以 2、4 或 8  $\mu\text{g/mL}$  的 ankaflavin 或 monascin 處理，IL-1 $\beta$  mRNA 表現量皆呈現劑量效應 (dose-dependent) 下降，且具顯著性差異 ( $p < 0.01$ )。以 citrinin 處理則無明顯降低的效果 (圖 4-25D)。

由圖 4-26A 結果顯示，以 15  $\mu\text{g/mL}$  的 RMDE 處理細胞，就達到顯著性抑制 IL-6 mRNA 的表現 ( $p < 0.01$ )，而當濃度提升至 30 和 60  $\mu\text{g/mL}$  時，抑制效果更達到控制組之水平。以 2  $\mu\text{g/mL}$  的 ankaflavin 處理細胞，其 IL-6 mRNA 的表現與控制組相當，具顯著性差異 ( $p < 0.01$ )，當濃度提升至 8  $\mu\text{g/mL}$ ，其 IL-6 mRNA 表現量更低於控制組 (圖 4-26B)。不管以 2、4 或 8  $\mu\text{g/mL}$  之 monascin 處理，IL-6 mRNA 的表現量皆遠低於 IR 組，與控制組相當，具顯著性差異 ( $p < 0.01$ ) (圖 4-26C)。不同濃度的 citrinin 處理，對於放射線所誘發之 IL-6 mRNA 表現並無影響 (圖 4-26D)。

綜合以上結果，RMDE 的處理能有效降低放射線所引起 Raw 264.7 細胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 的表現量，RMDE 中之 ankaflavin 對於這三種促發炎激素皆有良好的抑制效果，monascin 則能針對 IL-1 $\beta$  和 IL-6 進行抑制，對於 TNF- $\alpha$  則無明顯效果，citrinin 對於三種促發炎激素的表現無顯著性影

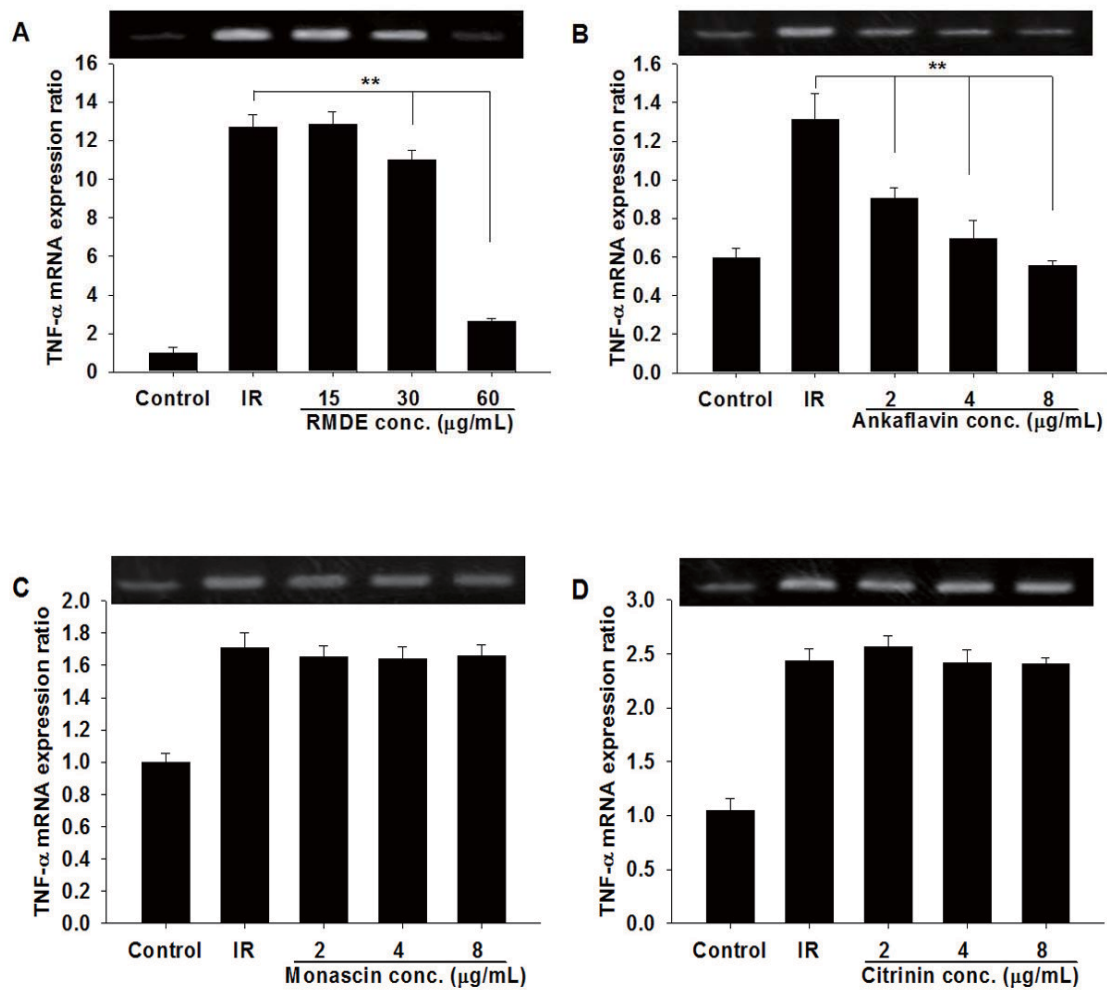


圖 4-24 放射線照射後處以不同樣品處理時 Raw 264.7 細胞中 TNF- $\alpha$  mRNA 表現之影響。A：RMDE；B：ankaflavin；C：monascin；D：citrinin。

Fig. 4-24 The effect of TNF- $\alpha$  mRNA expression level in Raw 264.7 cell treated with different material after irradiation. RMDE (A); ankaflavin (B); monascin (C); citrinin (D), \*\*,  $p < 0.01$  vs. IR.

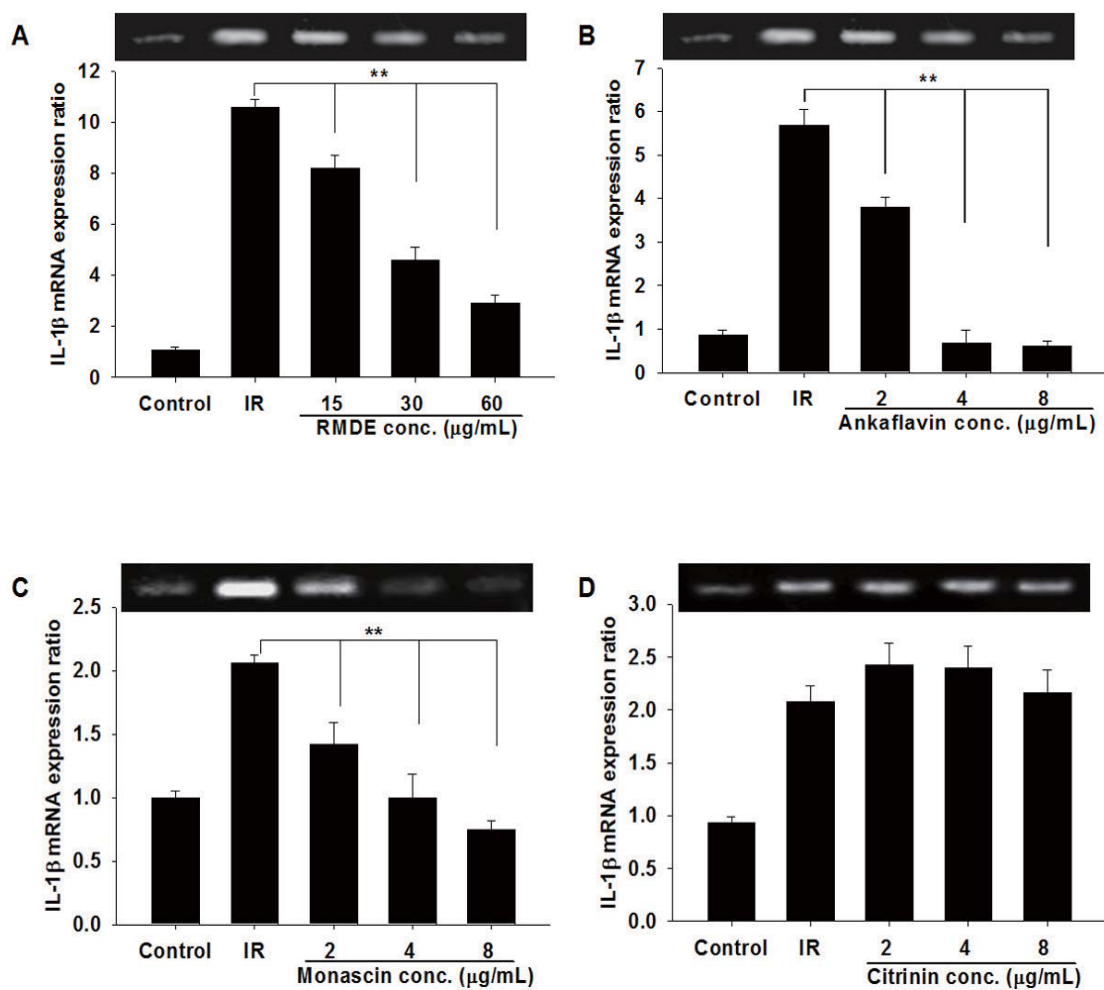


圖 4-25 放射線照射後處以不同樣品處理時 Raw 264.7 細胞中 IL-1β mRNA 表現之影響。 A：RMDE；B：ankaflavin；C：monascin；D：citrinin。

Fig. 4-25 The effect of IL-1β mRNA expression level in Raw 264.7 cell treated with different material after irradiation. RMDE (A); ankaflavin (B); monascin (C); citrinin (D), \*\*,  $p < 0.01$  vs. IR.



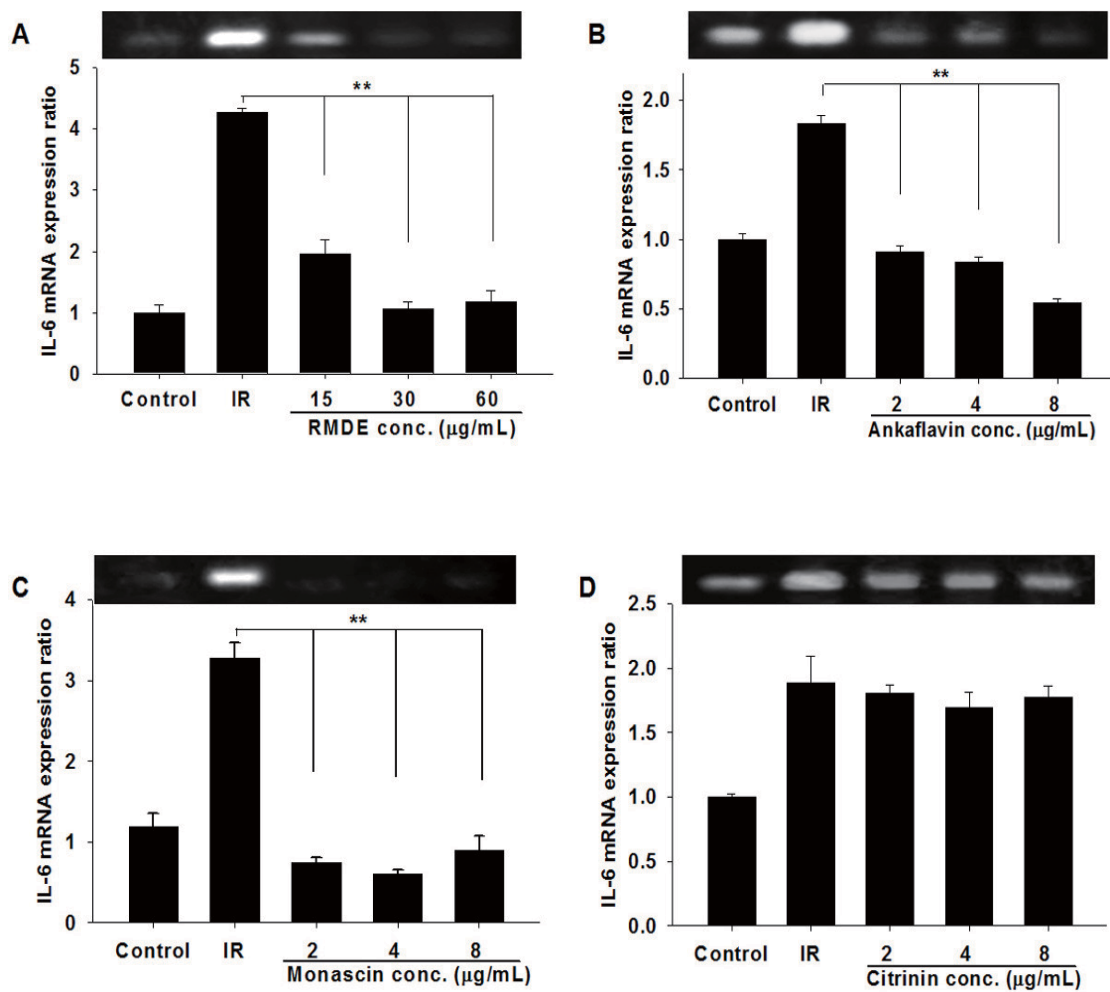


圖 4-26 放射線照射後處以不同樣品處理時 Raw 264.7 細胞中 IL-6 mRNA 表現之影響。 A : RMDE ; B : ankaflavin ; C : monascin ; D : citrinin。

Fig. 4-26 The effect of IL-6 mRNA expression level in Raw 264.7 cell treated with different material after irradiation. RMDE (A); ankaflavin (B); monascin (C); citrinin (D), \*\*,  $p < 0.01$  vs. IR.

響，由此可知 RMDE 之所以有良好抗發炎效果，應為 ankaflavin 和 monascin 的作用。

#### (四) 紅麴山藥酒萃物及其純物質對於放射線誘發 TGF- $\beta$ 1 之影響

為了瞭解 RMDE 中哪一種成分具有緩解放射線所引起 TGF- $\beta$ 1 上升之情況，以 RMDE 中之純物質 ankaflavin、citrinin 和 monascin 處理 Raw 264.7 細胞，觀察各種物質對於細胞 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表現之影響。

由圖 4-27A 得知，以 15、30 和 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 RMDE 處理，能有效降低細胞內 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的表現，呈現劑量效應 (dose-dependent)，且具顯著性差異 ( $P < 0.01$ )。低濃度的 ankaflavin (2 和 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 對於細胞內 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表現量上並無影響，但當濃度達 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時，與 IR 組相比，具顯著性降低 ( $P < 0.01$ ) (圖 4-27B)。與 ankaflavin 結果相同，在 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  之 monascin 與 IR 相比具有顯著性差異 ( $P < 0.01$ ) (圖 4-27B)。Citrinin 對於細胞中 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的表現並無影響。

由上述結果可以得知，RMDE 中的 ankaflavin 與 monascin，能抑制放射線所誘發 Raw 264.7 細胞中之 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的表現。

#### (五) 紅麴山藥酒萃物緩解放射線治療衍生副作用之作用機制

由本論文所得結果可以推測如圖 4-28 之機制。高能量的放射線會促使巨噬細胞活化，大量分泌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等促發炎激素，使得週邊組織產生嚴重的發炎反應，RMDE 的處理能減少巨噬細胞促發炎激素的分泌，其功效成分 ankaflavin 對三種促發炎激素皆有抑制 mRNA 表現的效果，而 monascin 則對 IL-1 $\beta$  和 IL-6 具抑制作用。此外，放射線會直接或經由 IL-1 $\beta$  和 IL-6 等促發炎激素活化 TGF- $\beta$  啟動纖維化相關訊息傳遞，RMDE 和其功效成分 ankaflavin 與 monascin 亦能藉由減少 IL-1 $\beta$  和 IL-6 的表現，而達到減少

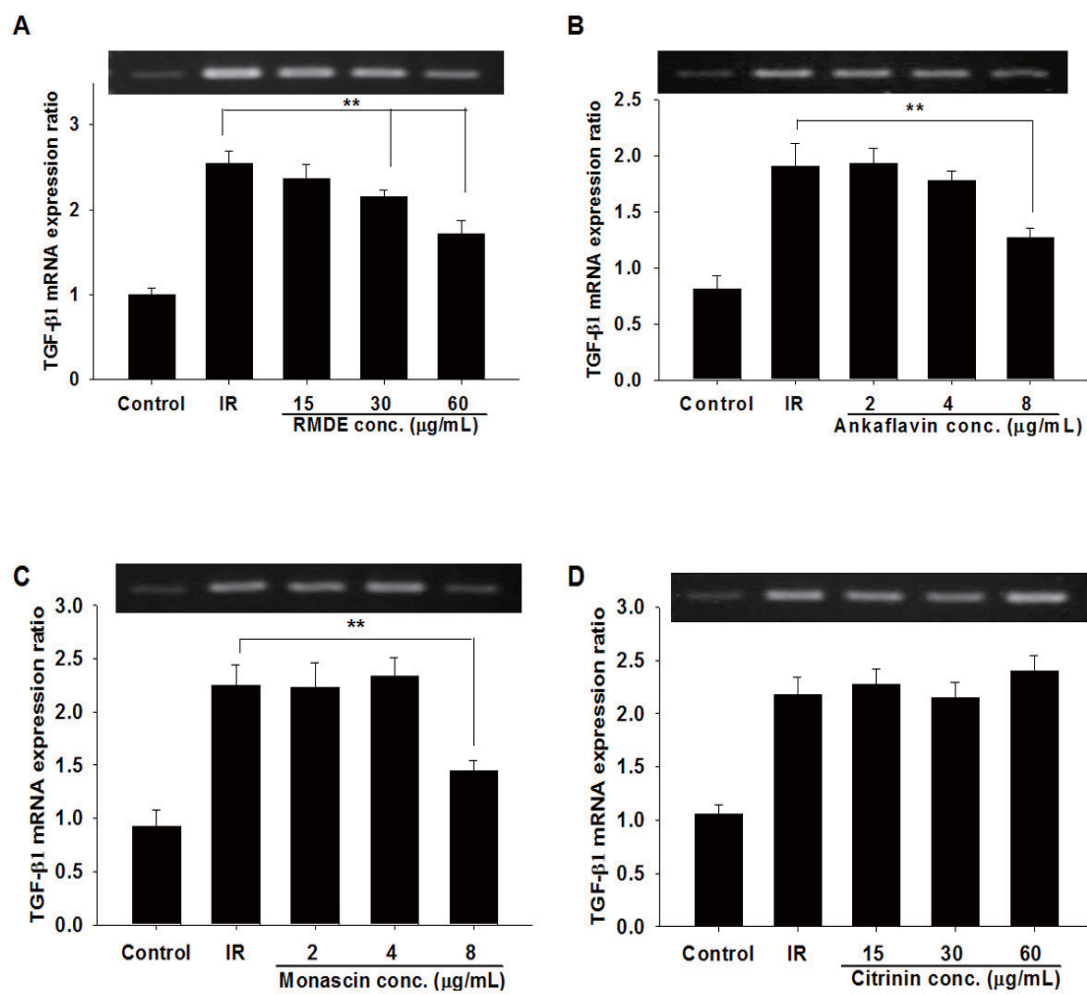


圖 4-27 放射線照射後處以不同樣品處理時 Raw 264.7 細胞中 TGF-β1 mRNA 表現之影響。 A：RMDE；B：ankaflavin；C：monascin；D：citrinin。

Fig. 4-27 The effect of TGF-β1 mRNA expression level in Raw 264.7 cell treated with different material after irradiation. RMDE (A); ankaflavin (B); monascin (C); citrinin (D), \*\*,  $p < 0.01$  vs. IR.

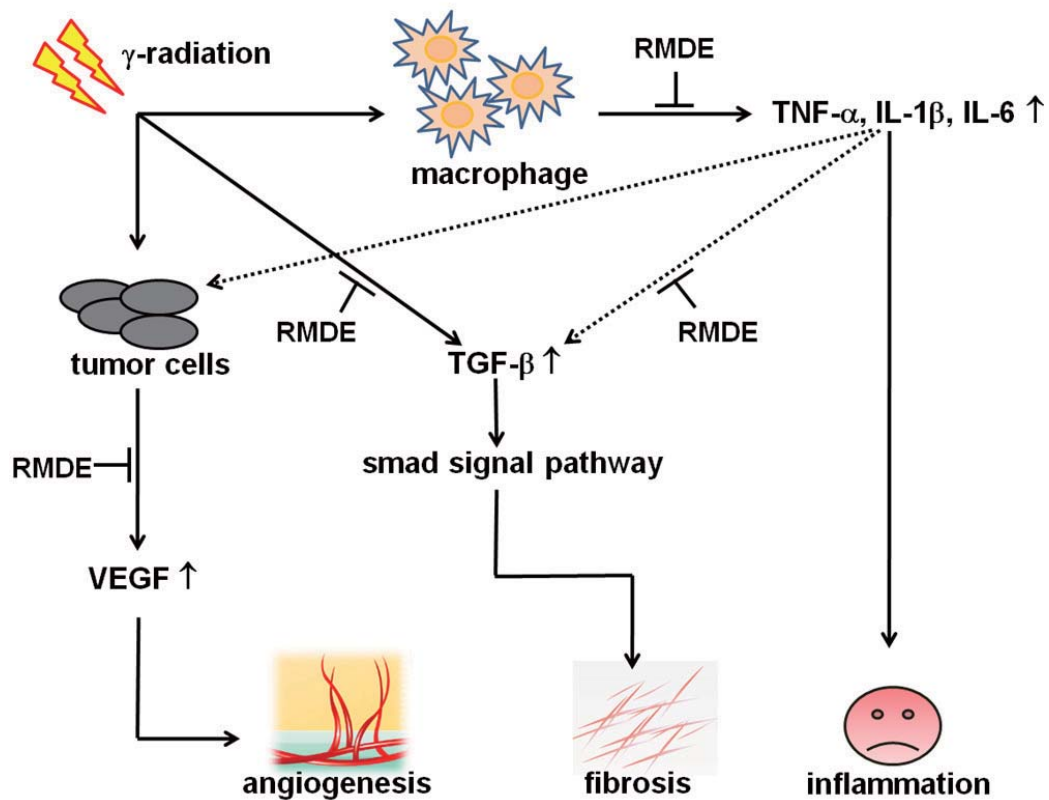


圖 4-28 紅麴山藥酒萃物緩解放射線治療衍生副作用之作用機制圖

Fig. 4-28 Mechanism of moderation of side effects of radiotherapy by ethanol extract of red mold dioscorea.

TGF- $\beta$ 1 的產生，防止纖維化路徑的啟動。此外放射線的照射與發炎情況下，皆會對腫瘤細胞造成損傷而促使腫瘤分泌血管新生因子 (VEGF) 造成腫瘤復發與轉移，RMDE 的處理能有效降低放射線治療後小鼠血清 VEGF 的表現，抑制血管新生。



## 第五章 綜合討論

放射線治療 (radiotherapy) 為現行癌症治療的重要方式之一，非侵入性治療模式優於外科手術，而局部性照射治療亦大大降低如化學藥物治療所造成之全身性反應。然而在放射線治療過程中，放射線除了會毒殺癌細胞以外，亦會使得體內氧化壓力增加，導致發炎反應，進而使得周邊正常組織產生纖維化甚至癌化的情形，嚴重影響治療效果，因此，如何有效降低因放射線所衍生的副作用，為一重要課題。

本研究以 B16-荷瘤小鼠 (B16 bearing mice) 建立放射線治療模式，由實驗結果顯示，餵食紅麴山藥酒萃物 (RMDE)，能有效降低小鼠在放射線治療後期所產生的腹水現象，亦能有效提升小鼠在放射線療程後的攝食量，進而使得小鼠體重上升，減少治療後期演變為癌症惡病質 (cachexia) 的機會。

在腫瘤變化上，lovastatin 為已知具有抑制癌細胞生長與促進腫瘤細胞凋亡 (Mo and Elson, 2004; Shellman et al., 2005; Wong et al., 2002)、抑制癌細胞轉移 (Alonso et al., 1998; Nubel et al., 2004; Shibata et al., 2004; Ho and Pan, 2009) 和抗發炎 (Lefer, 2002; McCullough, 2001; Yeung and Tsao, 2002) 等功效之化合物。餵食高劑量 RMDE (200 mg/kg) 組與餵食高劑量 lovastatin 組相當，具顯著性抑制放射線療程後腫瘤的復發；由腫瘤組織切片結果亦能觀察到，餵食低、高劑量的 lovastatin (25 和 50 mg/kg) 與 RMDE (100 和 200 mg/kg) 組別，小鼠腫瘤組織皆有大面積壞死的現象；經由細胞毒性試驗結果得知，使用 RMDE 所含之主要功效成分 ankaflavin、monascin 和 citrinin，對於黑色素細胞瘤 (B16-F0) 的抑制效果以 monascin 為最佳，抑制率達 44%，顯示 RMDE 中的 monascin 具有良好抑制腫瘤生長能力，此結果與文獻 monascin 具良好抗癌效果的結果相符 (Akihisa et al., 2005a)。此外，文獻指出，血清中過量的 TGF- $\beta$  會導致腫瘤的生成與轉移 (Dumont and Arteaga, 2003; Siegel and Massague, 2003)。由小鼠血清

TGF- $\beta$ 1 分析可以得知，餵食 RMDE 能有效降低小鼠血清中 TGF- $\beta$ 1 蛋白質的表現，抑制腫瘤生成。

於脾臟病理資料顯示，B16-荷瘤控制組每隻小鼠脾臟皆嚴重腫大，脾臟切片亦呈現脾臟組織有大量的淋巴球增生，而餵食高劑量的 RMDE (200 mg/kg) 組則完全與正常控制組相同，未發現任何小鼠有脾臟腫大的情況產生，顯示 RMDE 的餵食有助於減少體內持續性的發炎反應。

文獻指出，血清促發炎激素 (pro-inflammation cytokine)：TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的過度表現除了會造成腫瘤的轉移外亦會導致癌症惡病質 (cachexia) 的發生 (Moldawer and Copeland, 1997)。由本實驗結果顯示，放射線療程後會提升小鼠血清中 IL-1 $\beta$  和 IL-6 蛋白質的表現，對於 TNF- $\alpha$  蛋白質表現則無明顯影響，而 RMDE 的餵食與 lovastatin 組相同，皆能有效降低小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 蛋白質的表現，減少小鼠體內持續性的發炎反應。由放射線誘導巨噬細胞 (Raw 264.7) 發炎模式可以得知，RMDE 之所以有良好抗發炎效果，應為其功效成分 ankaflavin 與 monascin 的作用，ankaflavin 能針對細胞中促發炎激素 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表現進行抑制，monascin 則抑制了 IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 的表現，藉此緩解放射線治療所衍生的發炎反應。

由於 B16 黑色素細胞瘤為高度轉移之惡性腫瘤。文獻指出，運用非致死性劑量處理腫瘤細胞後，放射線能激發細胞轉移相關訊息的活化 (Bea et al., 2003; Dent et al., 2003; Artman et al., 2010)，且放射線能促使癌細胞分泌 VEGF，進而提升癌細胞對於放射線的抗性，減少放射線對於癌細胞的傷害 (Hovinga et al., 2005)。由血清測定結果顯示，放射線確實會刺激 B16 黑色素細胞瘤分泌 VEGF，但各臟器外觀與組織切片結果卻顯示，所有實驗組別在肺、肝、腎和脾臟上，並無腫瘤轉移的現象產生，推測可能是實驗過程較短，癌細胞尚無法透過新生的血管轉移至其他臟器，因而造成此結果。不過餵食 RMDE 與 lovastatin，確實可有效降低小鼠血清中 VEGF 的蛋白質濃度，減少血管的新生。此外，亦

有文獻指出，VEGF 大量表現與癌症惡性腹水有很大的相關性，(Mesiano et al., 1998; Numnum et al., 2006; Kobold et al., 2009)。由小鼠腹水發生率結果顯示，餵食 RMDE 能有效改善小鼠於放射線治療後期，腹水的產生，推測應為 RMDE 抑制腫瘤細胞分泌 VEGF 而達到減少腹水發生之效果。

在纖維化方面，放射線會直接或間接活化 TGF- $\beta$ 1，啟動 smad 訊息傳遞路徑，導致組織纖維化 (Bentzen, 2006)。此外，放射線治療後 IL-1 $\beta$  和 IL-6 大量表現所引起的發炎反應，亦會刺激 TGF- $\beta$ 1 的活化，使得組織產生纖維化的現象 (Chen et al., 2001; Chen et al., 2005)。由動物實驗結果顯示，餵食 RMDE 能有效降低小鼠血清中因放射線所引起的 TGF- $\beta$ 1 上升。經細胞實驗得知，RMDE 中的 ankaflavin 與 monascin 能顯著抑制放射線所誘發 Raw 264.7 細胞中之 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的表現。顯示，餵食 RMDE，能有效降低放射線療程後小鼠血清內之 TGF- $\beta$ 1 蛋白質含量，防止纖維化訊息傳遞路徑的啟動，避免組織纖維化的產生。

做為癌症治療的輔助品，如果使用劑量會對於生物體本身產生過大的毒性傷害，就算具優良的輔助效果，亦不能算是好的保健食品。由小鼠肝和腎臟的組織切片結果得知，本實驗所用之劑量對於實驗小鼠是安全的，對於肝與腎臟等代謝器官並不具毒性傷害。

綜合以上結果，紅麴山藥酒萃物確實能有效緩解放射線治療衍生的副作用，適合做為臨床癌症病患，在接受完放射線治療後之良好保健食品。有鑒於 ankaflavin 與 monascin 在本研究中具有良好輔助放射線治療的功效，但文獻上對於此兩種化合物的詳細作用機制並無太多的探討，因此，未來希望能針對紅麴色素 ankaflavin 與 monascin 做更深入的研究，看是否有機會發展成為臨床癌症治療藥物，將中國千年的紅麴智慧，繼續發揚光大。



## 第六章 參考文獻

- 蘇遠志與黃冬梨 (1981) 紅麴色素之動物飼養試驗。國立台灣大學農學院研究報告。21：98-112。
- 潘雪幸、王桂芸 (2003) 癌症惡病質病患之護理。長庚護理，14，387-394
- [CDER] U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2005) Guidance for Industry-Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf> Center for Drug Evaluation and Research.
- Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Ukiya, M., Kiyota, A., Sakamoto, N., Suzuki, T., Tanabe, N. and Nishino, H. (2005a) Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *J Agric Food Chem* **53**: 562-565.
- Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M., Kiyota, A., Yasukawa, K., Sakamoto, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Takayasu, J. and Nishino H. (2005b) Anti-tumor-initiating effects of monascin, an azaphilonoid pigment from the extract of *Monascus pilosus* fermented rice (red-mold rice). *Chem Biodivers* **2**: 1305-1309.
- Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J. and Springer, J. (1980) Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3957-3961.

- Alonso, D. F., Farina, H. G., Skilton, G., Gabri, M. R., De-Lorenzo, M. S. and Gomez, D. E. (1998) Reduction of mouse mammary tumor formation and metastasis by lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway of cholesterol synthesis. *Breast Cancer Res Treat* **50**: 83-93.
- Aniya, Y., Yokomakura, T., Yonamine, M., Nagamine, T. and Nakanishi, H. (1998) Protective effect of the mold *Monascus anka* against acetaminophen-induced liver toxicity in rats. *Jpn J Pharmacol* **78**: 79-82.
- Aniya, Y., Yokomakura, T., Yonamine, M., Shimada, K., Nagamine, T., Shimabukuro, M. and Gibo, H. (1999) Screening of antioxidant action of various molds and protection of *Monascus anka* against experimentally induced liver injuries of rats. *Gen Pharmacol* **32**: 225-231.
- Aniya, Y., Ohtani, I. I., Higa, T., Miyagi, C., Gibo, H., Shimabukuro, M., Nakanishi, H., and Taira, J. (2000) Dimeric acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. *Free Radic Biol Med* **28**: 999-1004.
- Artman, T., Schilling, D., Gnann, J., Molls, M., Multhoff, G. and Bayer, C. (2010) Irradiation-induced regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular endothelial growth factor in six human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **76**: 574-582.
- Balkwill, F. (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* **4**: 540-550.
- Bea, F., Blessing, E., Shelley, M. I., Shultz, J. M., and Rosenfeld, M. E. (2003) Simvastatin inhibits expression of tissue factor in advanced atherosclerotic lesions of apolipoprotein E deficient mice independently of lipid lowering: potential role of simvastatin-mediated inhibition of Egr-1 expression and activation. *Atherosclerosis* **167**: 187-194.
- Bentzen, S. M. (2006) Preventing or reducing late side effects of radiation therapy:

- radiobiology meets molecular pathology. *Nature Rev Cancer* **6**: 702-713.
- Bowen, J. M., Gibson, R. J., Cummins, A. G. and Keefe, D. M. (2006) Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. *Support Care Cancer* **14**: 713–731.
- Camphausen, K., Moses, M. A., Beecken, W. D., Khan, M. K., Folkman, J., and O'Reilly, M. S. (2001) Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer Res* **61**: 2207-2211.
- Chagas, G. M., Campello, A. P. and Klüppel, M. L. (1992a) Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. I. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of renal cortical mitochondria. *J Appl Toxicol* **12**: 123-129.
- Chagas, G. M., Oliveira, M. B. M., Campello, A. P., and Klüppel, M. L. W. (1992b) Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. II. Effect on respiration, enzyme activities, and membrane potential of liver mitochondria. *Cell Biochem Funct.* **10**: 209-216.
- Chen, Y., Rubin, P., Williams, J., Hernady, E., Smudzin, T., and Okunieff, P. (2001) Circulating IL-6 as a predictor of radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **49**: 641–648.
- Chen, J. J., Yao, P. L., Yuan, A., Hong, T. M., Shun, C. T., Kuo, M. L., Lee, Y. C. and Yang, P. C. (2003) Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* **9**: 729-737.
- Chen, Y., Hyrien, O., Williams, J., Okunieff, P., Smudzin, T., and Rubin, P. (2005) Interleukin (IL)-1A and IL-6: Applications to the predictive diagnostic testing of radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **62**: 260–266.

- Danesh, F. R. and Kanwar, Y. S. (2004) Modulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors in diabetic microangiopathy. *Faseb J* **18**: 805-815.
- Dent, P., Yacoub, A., Contessa, J., Caron, R., Amorino, G., Valerie, K., Hagan, M. P., Grant, S., and Schmidt-Ullrich, R. (2003) Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res* **159**: 283-300.
- Dulger, H., Alici, S., Sekeroglu, M. R., Erkog, R., Ozbek, H., Noyan, T. and Yavuz, M. (2004) Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with gastrointestinal cancer. *Int J Clin Pract.* **58**: 545-549.
- Dumont, N. and Arteaga, C. L. (2003) Targeting the TGF  $\beta$  signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell* **3**: 531-536.
- Endo, A. (1979) Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J Antibiot* (Tokyo) **32**: 852-854.
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C. and Williams, G. (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* **133**: 275-288.
- Freshney, R. I. (1994) Culture of animal cells a manual of basic technique, 3rd ed. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Fournier, C. and Taucher-Scholz, G. (2004) Radiation induced cell cycle arrest: an overview of specific effects following high-LET exposure. *Radiother Oncol* **73**: S119-S122.
- Gladskikh, O. P., Danilova, T. I., Kuznetsova, A. B., Ivanov, A. A., Andreeva, I., Alekseev, B. I., Frank, G. A. and Paltsev, M. A. (2004) Role of a transforming growth factor beta-1 in regulation of invasive growth of prostatic adenocarcinoma. *Arkh Patol.* **66**: 27-30.
- Glick, A. B. (2004) TGF beta1, back to the future: revisiting its role as a transforming growth factor. *Cancer Biol Ther.* **3**: 276-283.

- Goldman, M. (1997) The Russian radiation legacy: its integrated impact and lessons. *Environ. Health Perspect.* **105**: 1385–1391.
- Gorski, D. H., Beckett, M. A., Jaskowiak, N. T., Calvin, D. P., Mauceri, H. J., Salloum, R. M., Seetharam, S., Koons, A., Hari, D. M., Kufe, D. W. and Weichselbaum, R. R. (1999) Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res* **59**: 3374–3378.
- Haas-Kogan, D. A., Yount, G., Haas, M., Levi, D., Kogan, S. S., Hu, L., Vidair, C., Deen, D. F., Dewey, W. C. and Israel, M. A. (1996) P53-dependent G1 arrest and p53-independent apoptosis influence the radiobiologic response of glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **36**: 95-103.
- Hiroyuki, H., Toshio, T., Makoto, T., Susumu, O. and Kensuke, H. (1987) Inhibitory effects of citrinin on mitochondrial function. *J Appl Toxicol.* **51**: 1453-1454.
- Ho, B. Y. and Pan, T. M. (2009) The *Monascus* metabolite monacolin K reduces tumor progression and metastasis of Lewis lung carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 8258–8265.
- Hovinga, K. E., Stalpers, L. J., Van, B. C., Donker, M., Verhoeff, J. J., Rodermond, H. M., Bosch, D. A., Van, F. W. R. (2005) Radiation-enhanced vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in glioblastoma multiforme cell lines-a clue to radioresistance? *J Neurooncol* **74**: 99-103.
- Jackson, A. L. and Loeb, L. A. (2001) The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res.* **477**: 7-21.
- Janik, P., Briand, P., Hartmann, N. R. and Hansen, M. (1975) The effect of estrone-progesterone treatment on cell proliferation kinetics of hormone-dependent GR mouse mammary tumors. *Cancer Res* **35**: 3698-3704.
- Kalueff, A. V. and Nutt, D. J. (2007) Role of GABA in anxiety and depression.

- Depress Anxiety* **24**: 495-517.
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Mimura, T., Tanabe, N., Inada, A. and Nakanishi, T. (1987) Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **35**: 2484-2489.
- Kono, I. and Himeno, K. (1999) Antimicrobial activity of *Monascus pilosus* IFO 4520 against contaminant of koji. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 1494-1496.
- Koshikawa, T., Uematsu, N., Iijima, A., Katagiri, T. and Uchida, K. (2005) Alterations of DNA copy number and expression in genes involved in cell cycle regulation and apoptosis signal pathways in gamma-radiation-sensitive SX9 cells and -resistant SR-1 cells. *Radiat Res* **163**: 374-383.
- Kobold, S., Hegewisch-Becker, S., Oechsle, K., Jordan, K., Bokemeyer, C. and Atanackovic, D. (2009) Intraperitoneal VEGF inhibition using bevacizumab: a potential approach for the symptomatic treatment of malignant ascites? *Oncologist*. **14**: 1242-1251.
- Lai, F. M., Tanikella, T. and Cervoni, P. (1988) Effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) on vasodilation in resistance-sized arteries isolated from the monkey, rabbit, and rat. *J Cardiovasc Pharmacol* **12**: 372-376.
- Lazar-Molnar, E., Hegyesi, H., Toth, S. and Falus, A. (2000) Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* **12**: 547-554.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. and Ferrara, N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**: 1306-1309.
- Lefer, D. J. (2002) Statins as potent antiinflammatory drugs. *Circulation* **106**: 2041-2042.
- Lee, C. L., Tsai, T. Y., Wang, J. J. and Pan, T. M. (2006a) *In vivo* hypolipidemic

- effects and safety of low dosage *Monascus* powder in a hamster model of hyperlipidemia. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**: 533-540.
- Lee, C. L., Wang, J. J., Kuo, S. L. and Pan, T. M. (2006b) *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol lowering agent-monacolin K and antiinflammation agent-monascin. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**: 1254-1262.
- Lee, C. L., Wang, J. J. and Pan, T. M. (2006c) Synchronous analysis method for detection of citrinin and the lactone and acid forms of monacolin K in red mold rice. *J. AOAC Int.* **89**: 669-677.
- Lee, C. L., Hung, H. K., Wang, J. J. and Pan, T. M. (2007a) Red mold dioscorea has greater hypolipidemic and antiatherosclerotic effect than traditional red mold rice and unfermented dioscorea in hamsters. *J Agric Food Chem* **55**: 7162-7169.
- Lee, C. L., Kuo, T. F., Wang, J. J. and Pan, T. M. (2007b) Red mold rice ameliorates impairment of memory and learning ability in intracerebroventricular amyloid beta-infused rat by repressing amyloid beta accumulation. *J Neurosci Res* **85**: 3171-3182.
- Lee, C. L., Wang, J. J. and Pan, T. M. (2008) Red mold rice extract represses amyloid beta peptide-induced neurotoxicity via potent synergism of anti-inflammatory and antioxidative effect. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**: 829-841.
- Marples, B., Greco, O., Joiner, M. C. and Scott, S. D. (2003) Radiogenetic therapy: strategies to overcome tumor resistance. *Curr Pharm* **9**: 2105-2112.
- Martinkova, L., Juzlova, P. and Vesely, D. (1995) Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *J Appl Microbiol.* **79**: 609-616.
- Martinkova, L., Patakova-Juzlova, P., Krent, V., Kucerova, Z., Havlicek, V., Olsovsky, P., Hovorka, O., Rihova, B., Vesely, D., Vesela, D., Ulrichova, J. and Prikrylova,

- V. (1999) Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit Contam* **16**: 15-24.
- Mastruzzo, C., Crimi, N. and Vancheri, C. (2002) Role of oxidative stress in pulmonary fibrosis. *Monaldi Arch Chest Dis* **57**: 173-176.
- Matsuo, Y., Sawai, H., Funahashi, H., Takahashi, H., Sakamoto, M., Yamamoto, M., Okada, Y., Hayakawa, T. and Manabe, T. (2004) Enhanced angiogenesis due to inflammatory cytokines from pancreatic cancer cell lines and relation to metastatic potential. *Pancreas* **28**: 344-352.
- McCullough, P. A. (2001) The antiinflammatory effects of statins. *N Engl J Med* **345**: 1201-1210.
- Meldrum, B. S. (1975) Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int Rev Neurobiol* **17**: 1-36.
- Mesiano, S., Ferrara, N. and Jaffe, R. (1998) Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization. *Am. J. Path.* **153**: 1249-1256.
- Meng, Y., Beckett, M. A., Liang, H., Mauceri, H. J., Van, R. N., Cohen, K. S., Weichselbaum, R. R. (2010) Blockade of tumor necrosis factor alpha signaling in tumor-associated macrophages as a radiosensitizing strategy. *Cancer Res.* **70**: 1534-1543.
- Miida, T., Takahashi, A., Tanabe, N. and Ikeuchi, T. (2005) Can statin therapy really reduce the risk of Alzheimer's disease and slow its progression? *Curr Opin Lipidol* **16**: 619-623.
- Mo, H. and Elson, C. E. (2004) Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med* **229**: 567-585.



- Moldawer, L. L., Copeland, E. M. (1997) Proinflammatory cytokines, nutritional support, and the cachexia syndrome: interactions and therapeutic options. *Cancer* **79**: 1828-1839.
- Mundy, G., Garrett, R., Harris, S., Chan, J., Chen, D., Rossini, G., Boyce, B., Zhao, M. and Gutierrez, G. (1999) Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. *Science* **286**: 1946-1949.
- Muravyov, A. V., Yakusevich, V. V., Surovaya, L. and Petrochenko, A. (2004) The effect of simvastatin therapy on hemorheological profile in coronary heart disease (CHD) patients. *Clin Hemorheol Microcirc* **31**: 251-256.
- Murice-Lambert, E., Banford, A. B. and Folger, R. L. (1989) Histological preparation of implanted biomaterials for light microscopic evaluation of the implant-tissue interaction. *Stain Technol* **64**:19-24.
- Nathan, C. F. (1987) Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**: 319-323.
- Nubel, T., Dippold, W., Kaina, B. and Fritz, G. (2004) Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis* **25**: 1335-1344.
- Numnum, T. M., Rocconi, R. P., Whitworth, J. and Barnes, M. N. (2006) The use of bevacizumab to palliate symptomatic ascites in patients with refractory ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **102**: 425-428.
- Offersen, B. V., Knap, M. M., Marcussen, N., Horsman, M. R., Hamilton-Dutoit, S., Overgaard, J. (2002) Intense inflammation in bladder carcinoma is associated with angiogenesis and indicates good prognosis. *Br J Cancer* **87**: 1422-1430.
- Okunieff, P., Chen, Y., Maguire, D. J., Huser, A. K. (2008) Molecular markers of radiation-related normal tissue toxicity. *Cancer Metastasis Rev.* **27**: 363-374.
- Olive, P. L. (1998) The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by

- ionizing radiation. *Radiat Res* **150**: S42-S51.
- Pawlik, T. M. and Keyomarsi, K. (2004) Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **59**:928-942.
- Potten, C. S. (1990) A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine. *Int. J. Radiat. Biol.* **58**: 925–973.
- Ramachandran, A., Madesh, M., Balasubramanian, K. A. (2000) Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J. Gastroenterol. Hepatol* **15**: 109-120.
- Ramadori, G. and Armbrust, T. (2001) Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**: 777-784.
- Rozados, V. R., Hinrichsen, L. I., McDonnell, J. and Scharovsky, O. G. (2005) Lovastatin enhances *in vitro* radiation-induced apoptosis of rat B-cell lymphoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* **24**: 55-61.
- Rube, C. E., Uthe, D., Wilfert, F., Ludwig, D., Yang, K., König, J., Palm, J., Schuck, A., Willich, N., Remberger, K., and Rube, C. (2005) The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **61**: 1482-1492.
- Sankawa, U., Ebizuka, H., Noguchi, H., Isikawa, Y., Kitagawa, S., Yamaoto, Y., Kobayashi, T. and Iitak, Y. (1983) Biosynthesis of citrinin in *Aspergillus terreus*. *Tetrahedron* **39**: 3583-3591.
- Shellman, Y. G., Ribble, D., Miller, L., Gendall, J., Vanbuskirk, K., Kelly, D., Norris, D. A. and Dellavalle, R. P. (2005) Lovastatin-induced apoptosis in human melanoma cell lines. *Melanoma Res* **15**: 83-89.
- Shibata, M. A., Ito, Y., Morimoto, J. and Otsuki, Y. (2004) Lovastatin inhibits tumor growth and lung metastasis in mouse mammary carcinoma model: a

- p53-independent mitochondrial-mediated apoptotic mechanism. *Carcinogenesis* **25**: 1887-1898.
- Siegel, P. M. and Massague, J. (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nature Rev. Cancer* **3**: 807-821.
- Simpson, L. and Galanis, E. (2006) Recurrent glioblastoma multiforme: advances in treatment and promising drug candidates. *Expert Rev Anticancer Ther.* **6**: 1593-1607.
- Su, N. W., Lin, Y. L., Lee, M. H., and Ho, C. Y. (2005) Ankaflavin from *Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. *J Agric Food Chem* **53**: 1949-1954.
- Szumiel, I. (1998) Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells. *Radiat Res* **150**: S92-S101.
- Taira, J., Miyagi, C. and Aniya, Y. (2002) Dimerumic acid as an antioxidant from the mold, *Monascus anka*: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and hemeprotein-mediated oxidation. *Biochem Pharmacol* **63**: 1019-1026.
- Tobert, J. A. (2003) Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 517-526.
- Trikha, M., Corringham, R., Klein, B. and Rossi, J. F. (2003) Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res.* **9**: 4653-4665.
- Tsai, R. L., Ho, B. Y. and Pan, T. M. (2009) Red Mold Rice Mitigates Oral Carcinogenesis in 7,12-Dimethyl-1,2-Benz[a]anthracene-induced Oral Carcinogenesis in Hamster. *Evid Based Complement Alternat Med.* doi:10.1093/ecam/nep215
- Wang, J. J., Shieh, M. J., Kuo, S. L., Lee, C. L., and Pan, T. M. (2006) Effect of red

- mold rice on antifatigue and exercise-related changes in lipid peroxidation in endurance exercise. *Appl Microbiol Biotechnol.* **70**:247-253.
- Ward, J. (1994) DNA damage as the cause of ionizing radiation-induced gene activation. *Radiat. Res* **138**: S85–S88.
- Wei, L. H., Kuo, M. L., Chen, C. A., Chou, C. H., Cheng, W. F., Chang, M. C., Su, J. L. and Hsieh, C. Y. (2001) The anti-apoptotic role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by up-regulation of Mcl-1 through a PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* **20**: 5799-5809.
- Wei, L. H., Kuo, M. L., Chen, C. A., Chou, C. H., Cheng, W. F., Chang, M. C., Su, J. L. and Hsieh, C. Y. (2003) Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* **22**: 1517-1527.
- Wilkins-Port, C. E. and Higgins, P. J. (2007) Regulation of extracellular matrix remodeling following transforming growth factor-beta1/epidermal growth factor-stimulated epithelial-mesenchymal transition in human premalignant keratinocytes. *Cells Tissues Organs* **185**: 116-122.
- Withers, H. R. (1971) Regeneration of intestinal mucosa after irradiation. *Cancer* **28**: 75-81.
- Wong, W. W., Dimitroulakos, J., Minden, M. D. and Penn, L. Z. (2002) HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* **16**: 508-519.
- Wu, C. L., Lee, C. L., Pan, T. M. (2009) Red mold dioscorea has a greater antihypertensive effect than traditional red mold rice in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* **57**: 5035-5041.
- Yao, K. C., Komata, T., Kondo, Y., Kanzawa, T., Kondo, S. and Germano, I. M. (2003) Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation:

cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent 120 kinase inhibitors, and autophagy. *J Neurosurg* **98**: 378-384.

Yasukawa, K., Takahashi, M., Natori, S., Kawai, K., Yamazaki, M., Takeuchi, M., and Takido, M. (1994). Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mice. *Oncology* **51**: 108-112.

Yasukawa, K., Takahashi, M., Yamanouchi, S. and Takido, M. (1996) Inhibitory effect of oral administration of *Monascus* pigment on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* **53**: 247-249.

Yeung, A. C. and Tsao, P. (2002) Statin therapy: beyond cholesterol lowering and antiinflammatory effects. *Circulation* **105**: 2937-2938.

Yoshida, A., Pommier, Y. and Ueda, T. (2006) Endonuclease activation and chromosomal DNA fragmentation during apoptosis in leukemia cells. *Int J Hematol* **84**: 31-37.

Zaki, M. H., Nemeth, J. A. and Trikha, M. (2004) CNTO 328, a monoclonal antibody to IL-6, inhibits human tumor-induced cachexia in nude mice. *Int J Cancer* **111**: 592-595.